

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



**Identificação e estudo de espécies de *Botryosphaeria* sp. em
eucalipto e em montado de sobro**

Joana Filipa Rodrigues Neno

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente
Dissertação**

**Dissertação orientada por:
Professora Doutora Maria Teresa Rebelo e
Doutora Maria Helena Pires Bragança**

2016

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



Identificação e estudo de espécies de *Botryosphaeria* sp. em eucalipto e em montado de sobro

Joana Filipa Rodrigues Neno

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação

Dissertação orientada por: Professora Doutora Maria Teresa Rebelo (Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa) e Doutora Maria Helena Pires Bragança (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária - INIAV)

2016

INDÍCE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Importância da floresta	1
1.2. O eucalipto	2
1.3. O sobreiro	3
1.4. A Família Botryosphaeriaceae	5
1.5. Enquadramento do tema e Objetivos	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Prospeção e recolha de amostras	9
2.2. Processamento de amostras para isolamento de fungos	11
2.3. Identificação específica	12
2.3.1. Com base em características morfológicas	12
2.3.1.1. Morfologia da cultura	12
2.3.1.2. Identificação a partir das características dos esporos	13
2.3.2. Molecular	14
2.3.2.1. Extração de ADN	14
2.3.2.2. Amplificação por reação de PCR - ITS e EF1- α	14
2.3.2.3. Sequenciação e caracterização filogenética	16
2.4. Ensaios de patogenicidade	16
2.4.1. Delineamento dos ensaios	17
2.4.2. Obtenção das plantas e envasamento	17
2.4.2.1. Em sobreiros (<i>Quercus suber</i>)	17
2.4.2.2. Em eucaliptos (<i>Eucalyptus globulus</i> e <i>Eucalyptus nitens</i>)	18
2.4.3. Inoculação dos fungos	18
2.4.4. Avaliação dos sintomas e Análise estatística	19
3. RESULTADOS	20
3.1. Prospeção e recolha de amostras	20

3.2. Identificação das amostras	20
3.2.1. Morfologia	21
3.2.2. Identificação molecular	24
3.3. Ensaio de Patogenicidade	38
3.3.1. Testes de patogenicidade – Postulados de Koch	38
3.3.1.1. Sobreiro - Patogenicidade das espécies de Botryosphaeriaceae isoladas em sobreiro: <i>Diplodia corticola</i> ; <i>D. quercivora</i> e <i>Dothiorella</i> sp.	38
3.3.1.2. Eucalipto – Patogenicidade das espécies de Botryosphaeriaceae isoladas em eucalipto: <i>Neofusicoccum parvum</i> e <i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	39
3.3.2. Testes de patogenicidade – Inoculações cruzadas	40
3.3.2.1. Efeito no sobreiro das espécies de Botryosphaeriaceae mais frequentemente isoladas do eucalipto - <i>Neofusicoccum parvum</i> e <i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	40
3.3.2.2. Efeito em <i>Eucalyptus globulus</i> e <i>E. nitens</i> da espécie de Botryosphaeriaceae isolada de sobreiro - <i>Diplodia corticola</i>	41
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	42
5. BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	51
ANEXO I	51
ANEXO II	52

AGRADECIMENTOS

Em primeiro às minhas orientadoras, à Doutora Helena Bragança que tornou possível a realização deste trabalho, sempre me apoio-o, orientou, ajudou e que principalmente nestes últimos meses foi uma espécie de segunda mãe; à Professora Doutora Teresa Rebelo por ter aceite ser minha orientadora, e também sempre que precisei não hesitou em apoiar e ajudar-me na conclusão deste trabalho.

Ao E. Diogo e à Joana Henriques por toda a ajuda prestada e ensinamentos para estes trabalho.

Ao Quim, à Marina e à Florinda por todos os bons momentos partilhados no laboratório e principalmente pela vossa amizade; à minha companheira de viagem, Ana Lança, sem ela estes últimos dias teriam sido muito mais cansativos e menos descontraídos.

A todos os restantes que se cruzaram comigo, ao longo das minhas idas ao INIAV e de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Em especial também, os meus pais, principalmente a minha mãe, e ao Simão.

Este trabalho foi financiado pelos projetos:

- ✓ PTDC/AGR-FOR/3807/2012 Potential impact of climate changes on Botryosphaeriaceae-related diseases of Eucalyptus spp. in Portugal;
- ✓ Protocolo Eucalipto RAIZ/ALTRI FLORESTAL 2014-2016 “Estudo das Doenças do eucalipto – prospecção e controlo”.

RESUMO

Alguns fungos da família Botryosphaeriaceae são considerados organismos muito agressivos em ambiente florestal. Apesar de isoladamente algumas das espécies desta família serem parasitas fracos, existem outras que em associação com fatores de stress, são consideradas parasitas agressivos. Esta família é encontrada em todos os climas e geografias do mundo, com a exceção das regiões polares.

Nos últimos anos a área correspondente à floresta em Portugal tem tido um grande decréscimo, não só pelos grandes incêndios que todos os anos lavram no país, mas devido ao aumento de pragas e doenças no mesmo período que afetam as nossas espécies florestais. A economia portuguesa também depende muito da atividade do Sector da Pasta e do Papel e da Indústria da cortiça. Portugal é o maior produtor de cortiça a nível mundial.

Recentemente descrita, *Diplodia corticola* é considerada uma espécie muito agressiva para *Quercus* spp. e as espécies *Neofusicoccum parvum* e *N. eucalyptorum*, são ambas frequentemente associadas à presença de cancrios em *Eucalyptus* spp.

Resultados preliminares, permitiram detetar com alguma frequência a presença de fungos desta família em Portugal, tanto em eucaliptos como em montados de sobreiro.

Este trabalho teve como objetivo identificar as principais espécies de Botryosphaeriaceae existentes em *Quercus suber* e em *Eucalyptus globulus*, através de recolha de amostras (troncos e ramos) com sintomas e sinais de doença. Posteriormente, procedeu-se ao isolamento em meio de cultura das espécies encontradas e identificação morfológica e molecular das mesmas.

Foram realizados ensaios de patogenicidade em hospedeiros jovens, das espécies isoladas, para determinar a agressividade dos isolados e a resistência/tolerância de diferentes clones/famílias de *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus nitens* e *Quercus suber*, concluindo que umas estão extremamente associadas ao declínio do montado e a problemas fitossanitários em eucalipto.

Realizaram-se também inoculações cruzadas com intuito de verificar a patogenicidade dos mesmos isolados no outro hospedeiro em estudo. Das três espécies testadas, *D. corticola*, *N. parvum* e *N. eucalyptorum*, só *N. parvum* se mostrou realmente agressiva tanto em eucaliptos como em sobreiros.

Conseguiu-se a primeira deteção de *Diplodia quercivora* em *Quercus suber* e na Europa e de *Neofusicoccum eucalyptorum* também na Europa.

Palavras-chave:

Botryosphaeriaceae; *Quercus suber*; *Eucalyptus globulus*; Problemas fitossanitários.

ABSTRACT

Some fungi of the Botryosphaeriaceae are considered to be very aggressive organisms to forest environment. Although separately some of the species within this family are weak parasites, there are others that in association with stress factors, primarily, are considered aggressive parasites. This family is found in all climates and geographies of the world, with the exception of the polar regions.

In the last years the area corresponding to the forest in Portugal has been a large decrease, not only by the huge fires that every year till the country, but due to the increase of pests and diseases in the same period that affect our forest species. The Portuguese economy also relies heavily on the activity of the pulp and paper sector and cork industry. Portugal is the largest cork producer in the world.

Recently described, *Diplodia corticola* is considered aggressive to *Quercus* spp. and *Neofusicocum parvum* and *N. eucalyptorum*, are both often associated with the presence of cancer in *Eucalyptus* spp.

Preliminary results made it possible to detect often the presence of fungi of this family in Portugal, both in *Eucalyptus* and cork oak forests.

This work had as objective to identify the main species of Botryosphaeriaceae sp. *Quercus suber* existing in and *Eucalyptus globulus*, through sampling (trunks and branches) with symptoms and signs of disease. Subsequently, the isolation in fungi culture of species found and morphological and molecular identification of the same.

Pathogenicity tests were performed in young hosts, the isolated species to determine the aggressiveness of the isolates and resistance / tolerance of different clones / families from *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus nitens* and *Quercus suber*.

With this work we were able to check which of these species of Botryosphaeriaceae are more aggressive to the hosts under study, concluding that a highly associated with the decline of the mounted and phytosanitary problems in eucalyptus.

There were also cross-inoculation in order to verify the pathogenicity of these isolates in another host in the study. Of the three species tested, *D. corticola*, *N.*

and *N. parvum eucalyptorum*, only *N. parvum* is really aggressive both showed in eucalyptus trees as oaks.

First report of *Diplodia quercivora* on *Quercus suber* and in Europe, as well as the first report of *Neofusicoccum eucalyptorum* in Europe.

Keywords:

Botryosphaeriaceae; *Quercus suber*; *Eucalyptus globulus*; phytosanitary problems.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância da floresta

De acordo com o 6º Inventário Florestal Nacional, a floresta corresponde a 35% do uso do solo em Portugal continental, seguindo-se as áreas de matos e pastagens com 32% e agricultura/áreas agrícolas com 24%. No entanto verificou-se uma diminuição de - 4.6% de área florestal durante o período de 1995 a 2010, cerca de 10mil ha/ano. Esta diminuição deve-se sobretudo à conversão de áreas de florestas para áreas de mato e pastagens e uma pequena parte (28 mil ha) para áreas de uso urbano (ICNF, 2013).

A floresta portuguesa, principalmente nos últimos anos, tem sido muito afetada pelos incêndios, provocados não só por temperaturas elevadas, mas também (a maioria) por ação humana. As doenças, entre as quais o nemátode da madeira do pinheiro que por exigência dos regulamentos fitossanitários tem implicado cortes de pinheiro bravo (ICNF, 2013), têm contribuído também para a diminuição da área florestal.

A floresta em Portugal tem grande interesse/impacto económico e ecológico, pois é dela que provêm vários bens e serviços essenciais, tais como madeira (construção, produção de biomassa, produção de pasta de papel), sementes, cortiça mas também a conservação do solos e o lazer (Pessoa *et al.*, 2014).

O eucalipto e o sobreiro são as duas espécies florestais mais abundantes em Portugal, ocupando cerca de 812 mil ha (26%) e 737 mil ha (23%) respetivamente, constituindo parte dos 35% de floresta nacional (figura 1), no entanto entre 1995 e 2010, o eucalipto passou de terceira espécie para primeira espécie mais abundante em Portugal (ICNF, 2013).

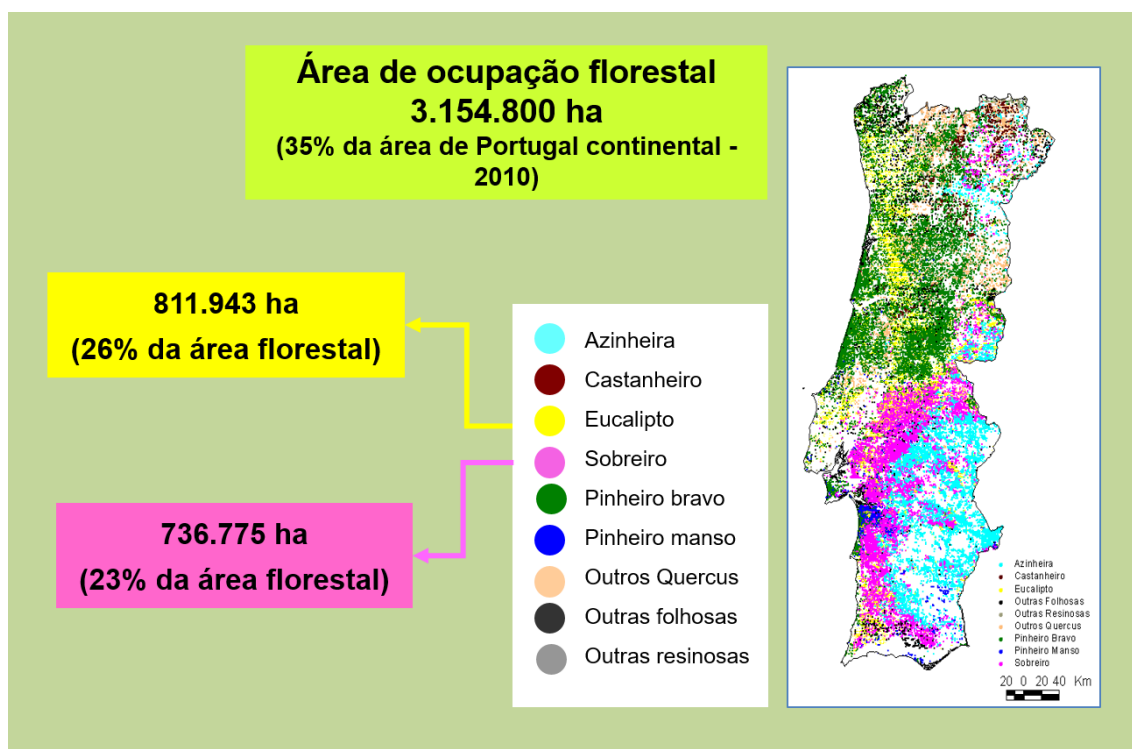


Figura 1- Área de ocupação florestal em Portugal (ICNF 2013)

1.2. O eucalipto

O eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) é originário da Austrália, e foi introduzido em meados do século XIX, no Sul da Europa. A Portugal chegou como árvore ornamental, em meados desse século, numa época que havia uma extrema falta de madeira (Alves *et al.*, 2007).

É uma espécie de crescimento rápido, de elevada produtividade, com troncos apurados e esguios, explorada em plantações monoespecíficas em regime de talhadia, com ciclos de crescimento à volta dos 12 anos. Normalmente após 3-4 cortes, as plantações são replantadas ou convertidas para outros usos (Soares *et al.*, 2007).

“A produtividade potencial para o eucalipto é aproximadamente o dobro da do pinheiro bravo ($16 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ aos 12 anos contra $7 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ aos 40-45 anos, respetivamente)” (Soares *et al.*, 2007).

Esta espécie florestal possui um papel relevante na economia portuguesa, tendo uma notável participação na balança comercial externa, devido à importância da área que ocupa, à elevada rentabilidade da sua cultura, mas também por ser desde a década

de 1940, a matéria-prima da indústria da pasta para papel, um dos principais sectores industriais da economia do país (Alves *et al.*, 2007; CELPA, 2015).

Em Portugal durante muito tempo, as plantações de eucalipto quase não apresentaram problemas fitossanitários, no entanto nas últimas décadas houve um grande aumento de problemas causados por pragas e doenças (Branco *et al.*, 2014)

Insetos como *Phoracantha semipunctata* Fab. ou *Gonipterus plantensis* Marelli têm causado grandes perdas de produção. Esta situação tem sido agravada com o aumento de novas pragas originárias da Austrália, assim como o aumento de novas doenças emergentes (Alves *et al.*, 2007; Branco *et al.*, 2014).

Em relação às doenças causadas por organismos patogénicos em eucaliptos, até muito recentemente só os géneros *Botryosphaeria* spp. e *Mycosphaerella* spp. eram considerados importantes (Branco *et al.*, 2008 ; Silva *et al.*, 2009). Contudo, estudos recentes comprovam que as doenças provocadas por fungos têm maior impacto do que originalmente se suspeitava. Em Portugal, *Botryosphaeria dothidea* (Moug. Ex Fr.) Ces. & De Not. (Moug. Ex Fr.) Ces. & De Not., *Neofusicoccum eucalyptorum* (Crous, H. Sm. ter & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips e *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips foram relatados em associação com cancrios e dieback (Branco *et al.*, 2014).

Apesar da relevância económica das plantações de *E. globulus* em Portugal, poucos estudos têm abordado os fungos que lhes provocam doença. Por exemplo, MLD (doença da folha *Mycosphaerella*) causada por várias espécies *Mycosphaerella* foi relatado em árvores jovens de *E. globulus* (Silva *et al.*, 2009). e a *Teratosphaeria gauchensis* (M.N. Cortinas, Crous & M.J. Wingf.) M.J. Wingf. & Crous também afeta os troncos de árvores adultas (Silva *et al.*, 2015).

1.3. O sobreiro

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma espécie nativa da bacia Mediterrânica Ocidental, que surge de forma natural em Portugal, Espanha, em zonas costeiras do Sul de França, Oeste de Itália e Norte de África (Marrocos, Norte da Argélia e Tunísia) e em algumas ilhas do Mediterrâneo Ocidental (Sicília, Córsega e Sardenha) (Natividade, 1990).

O sobreiro distingue-se dos restantes carvalhos por ter “um considerável desenvolvimento que pode atingir o invólucro suberoso do tronco e dos ramos; a

pureza e homogeneidade do tecido suberoso e das suas notáveis propriedades físicas, mecânicas e químicas; e a capacidade que a árvore possui de regenerar uma nova assentada geradora de cortiça quando se despojam aqueles órgãos do revestimento protetor” (Natividade, 1990).

É uma espécie de crescimento lento, de frutificação tardia entre os 15 e 20 anos, e é a única quercínea produtora de cortiça da região mediterrânea (Natividade, 1990).

Portugal foi o primeiro país a proteger legalmente o montado de sobreiro, proibindo o seu abate e incentivando à sua plantação e exploração através do Decreto-lei nº 169/2001, é ainda o maior produtor mundial de cortiça, produzindo mais de 50% da cortiça ao nível mundial, em que a extração da cortiça para fabrico de rolhas é uma indústria com elevada importância económica (dados APCOR - Associação Portuguesa de Cortiça).

Os montados de sobreiro na região do Mediterrâneo têm sido afetados por um declínio progressivo nas últimas décadas, um acontecimento que se estende também a outras espécies de carvalho na Europa. Vários problemas bióticos e abióticos têm sido citados como fatores envolvidos no declínio do sobreiro (Luque *et al.*, 2008).

A falta de regeneração, e a diminuição da qualidade da cortiça são motivos de grande preocupação. As altas temperaturas e os períodos de seca, o empobrecimento dos solos devido a práticas agrícolas, em conjunto com as diferentes pragas e doenças são alguns destes fatores (Cabral *et al.*, 1993; Branco *et al.*, 2014).

Associados aos surtos de mortalidade e declínio estão sintomas como folhas secas e descoloridas, pontas dos ramos secos, desbastes das copas, cancrios no tronco e ramos com presença de insetos e fungos, e um contínuo processo anormal de morte lenta (Branco *et al.*, 2014).

Os fungos *Phytophthora* spp.; *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) Kumm; *Botryosphaeriaceae* spp.; *Biscogniauxia mediterranea* (de Not) Kuntze (*SynHypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill.); *Coryneum modomium* (Sacc.) Griff. & Maubl.; *Endothiella gyrosa* Sacc. (Sousa *et al.*, 2007); *Apiognomonina quercina* (Kleb.) Höhn. e *Pleurophoma cava* (Schulzer) Boerema, Loer. & Hamers têm sido referenciados com causadores de doença no Sobreiro (Linaldeddu *et al.*, 2009; Branco *et al.*, 2014).

Os fungos do género *Phytophthora* spp., mais concretamente *Phytophthora cinnamomi* Rands (Moreira *et al.*, 1999; Moreira e Martins, 2005) e a *Diplodia corticola* AJL Phillips, A Alves & Luque (Alves *et al.*, 2004) são os principais agentes primários de doença, que provocam mortalidade nos sobreiros em Portugal (Branco *et al.*, 2014).

Outros fungos, entre os quais: *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze que se encontra num grande leque de hospedeiros, tendo a sua distribuição muito mais alargada em montado, mas não é considerado com um parasita primário (Henriques *et al.*, 2016); *Cryphonectria naterciae* M.H. Bragança, E. Diogo, & A.J.L. Phillips é uma espécie relativamente nova (só encontrada em sobreiro e castanheiro) e que até agora não se provou que seja patogénica em sobreiro (Bragança *et al.*, 2011).

1.4. A Família Botryosphaeriaceae

Na família *Botryosphaeriaceae* existem pelo menos 17 géneros diferentes, são eles: *Barriopsis*, *Botryobambusa*, *Botryosphaeria*, *Cophinforma*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Endomelanconiopsis*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Neodeightonia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Phaeobotryon*, *Pseudofusicoccum*, *Spencermartinsia*, *Sphaeropsis*, *Tiarosporella* (Phillips *et al.*, 2013).

Em Portugal sabe-se que existem algumas espécies da família *Botryosphaeriaceae*: *Diplodia corticola*, *Diplodia intermedia*, *Diplodia malorum*, *Diplodia mutila*, *Diplodia sapinea*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella ibérica*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum luteum*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum protearum*, (Phillips *et al.*, 2013).

Os membros da família de fungos *Botryosphaeriaceae* (*Botryosphaeriales*, *Ascomycetes*), foram descritos pela primeira vez na década de 1820 como espécies de *Sphaeria* (Fries) (Slippers & Wingfield, 2007).

A taxonomia do género *Diplodia* é bastante complicada pois as características diferenciadoras das diferentes espécies são ténues e escassas e baseiam-se fundamentalmente em características morfológicas dos anamorfos, uma vez que os teleomorfos (estados sexuais) raramente se detetam na natureza ou se formam em cultura artificial (Denman *et al.*, 2000).

Atendendo a que espécies próximas são morfologicamente indistintas (van Niekerk *et al.*, 2006) e que a variabilidade intraespecífica é também acentuada (Luque *et al.*, 2005), a identificação das espécies de *Botryosphaeriaceae* nem sempre é fácil.

Presentemente, na caracterização das espécies de *Botryosphaeriaceae* a abordagem usada é polifásica, conjugando dados da morfologia com dados biomoleculares (técnicas baseadas em PCR e sequenciação de DNA). A elevada resolução destas técnicas tem conduzido à reclassificação de algumas espécies e à criação e descrição de novos géneros e espécies (Slippers *et al.*, 2004). Não obstante os inúmeros

progressos alcançados, as dificuldades na identificação destes fungos têm aumentado (Mohalin *et al.*, 2007; van Niekerk *et al.*, 2006). As espécies de Botryosphaeriaceae têm uma distribuição universal (expeto regiões polares), ocorrendo num grande número de hospedeiros herbáceos e lenhosos, quer em angiospérmicas quer em gimnospérmicas.

O enquadramento taxonómico dos anamorfos já contemplou 18 géneros distintos, mas posteriormente a maioria foi considerada sinónimo de *Diplodia* (conídios maioritariamente ovóides, corados e de parede espessa) ou de *Fusicoccum* (conídios fusiformes, hialinos e de parede espessa) (Phillips *et al.*, 2013). No entanto, muitos desses anamorfos apresentam características intermédias e também existem outros fungos com anamorfos idênticos a *Diplodia* ou *Fusicoccum* que têm actualmente o seu teleomorfo fora do género *Botryosphaeria* (Crous *et al.*, 2006).

A família Botryosphaeriaceae inclui espécies patogénicas, para culturas agrícolas, plantas de viveiros e plantações florestais. Atualmente, após uma grande reestruturação taxonómica desta família de fungos, mais de 2000 nomes estão ligados a esta família, incluindo os teleomorfos e anamorfos dos quais *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* e *Sphaeropsis* contêm a maioria das espécies (Slippers & Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013).

1.5. Enquadramento do tema e Objetivos

Este trabalho de mestrado teve lugar no âmbito de um estudo mais amplo e alargado no tempo, a decorrer no INIAV, cujo objetivo é verificar a distribuição de espécies da família Botryosphaeriaceae nas principais essências florestais em Portugal e estudar o seu impacto no declínio do montado e na sanidade de matas de eucalipto e pinheiro.

Este trabalho surge da necessidade que tem havido de tentar perceber o que tem provocado o aumento acentuado do declino do montado de sobro, ecossistema extremamente importante na região Mediterrânea e também o incremento de áreas de eucalipto afetadas por fungos

Portugal possui a maior extensão de sobreiro do mundo (APCOR, 2014). Como noutros países mediterrânicos inúmeras atividades/ espécies dependem direta e indiretamente para a sua sobrevivência do montado de sobro, este sistema de uso múltiplo ago-florestal (Costa & Pereira, 2007) tão característico do centro e sul do nosso país. O declínio do montado pode pôr em risco muitas espécies que vivem

neste ecossistema (eg. animais, vegetais, fungos), mas também a sustentabilidade de toda a cadeia da cortiça, uma das nossas mais importantes indústrias que fixa as populações que desta fileira dependem, as quais ao mesmo tempo são fundamentais para a sobrevivência do montado (Bugalho *et al.*, 2011). Para além dos aspetos económicos e da conservação de espécies, outros aspetos sociais e ecológicos como a conservação dos solos, retenção de água e/ou o sequestro de carbono (o montado fixa até 14 milhões de toneladas de CO₂/Ano – APCOR, 2016), são fundamentais a médio e longo prazo para a boa qualidade de vida das populações mediterrânicas. O eucalipto, apesar de alguma controvérsia que tem criado no nosso país, para além de muito importante economicamente (CELPA, 2015) e de estar na base de uma das fileiras agroflorestais que mais postos de trabalho cria no nosso país, constitui um reservatório de carbono considerável e uma poderosa fonte de biocombustíveis (responsável pela produção de 4,2% de toda a eletricidade consumida em Portugal - dados CELPA, 2015), fatores cada vez mais valorizados pela atividade humana.

Como já há algum tempo que coexistem plantações de eucalipto com florestas nativas de carvalhos, principalmente com sobreiros, os saltos entre hospedeiros podem ser bem mais comuns do que se supunha até aqui para as espécies de Botryosphaeriaceae (Pérez *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2010), principalmente em Portugal onde estas duas espécies florestais (eucalipto e sobreiro) estão muito presentes, encontrando-se sempre muito próximas, ou então partilhando o mesmo espaço (nalguns casos existe mesmo consociação).

A nível nacional tem havido uma preocupação constante e crescente por parte das Autoridades Nacionais (DGAV e ICNF), Instituições de investigação (estatais e privadas) e Associações de produtores, para os problemas fitossanitários que têm sido verificados em várias espécies florestais e agrícolas. Se por um lado há um aumento de organismos nocivos para as plantas, que se supõe ser devido quer à globalização quer eventualmente às alterações climáticas, por outro lado há cada vez mais restrições à utilização de produtos fitossanitários (nocivos para pessoas/animais e para o ambiente). Para se conseguir uma gestão sustentável dos povoamentos florestais/áreas agrícolas sem recorrer a pesticidas, é necessário um estudo aprofundado que permita esclarecer quais os principais agentes patogénicos que estão a afetar as plantas em território nacional e o seu modo de atuação, para que se possam combater com recurso a silvicultura adequada, a espécies melhoradas e mais preparadas para resistirem ao stress e ao ataque de patogénicos.

Os objetivos principais deste trabalho foram a identificação de espécies da família Botryosphaeriaceae associadas a sintomas de doença em montado de sobreiro e em povoamentos florestais de eucalipto em Portugal continental. Foi efetuada a prospeção de sinais e sintomas em povoamentos de sobreiro e de eucalipto, a recolha de material vegetal com sintomas de doença e procedeu-se ao isolamento dos fungos e sua identificação específica recorrendo às características morfológicas e biomoleculares (espaçador interno transcrito do ADN ribossomal – ITS e fator de alongamento 1alfa – EF1- α). Após a identificação das espécies foi verificada a sua virulência para cada um dos hospedeiros, através de ensaios de patogenicidade realizados em estufa. Atendendo a que os dois hospedeiros se encontram muitas vezes associados geograficamente, outro objetivo do trabalho foi o de verificar, através de ensaios em estufa, qual o efeito no sobreiro das espécies mais comumente encontradas no eucalipto e vice-versa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Prospeção e recolha de amostras

Para seleccionar as parcelas de amostragem, foi efetuada em várias regiões do país uma prospeção preliminar, com o objetivo de fazer uma pesquisa de sintomas e sinais de doença em povoamentos de sobreiro e de eucalipto. Esta prospeção foi direcionada para as zonas do país em que estas duas espécies florestais têm maior expressão, em concordância com o mapa de distribuição do sobreiro e do eucalipto em Portugal (Minho, Trás-os-Montes, Beira Litoral, Beira Interior, Ribatejo, Alentejo e Algarve), e com os registos recentes de problemas detetados pelas equipas do INIAV (Helena Bragança - Comunicação pessoal).

Após a caracterização preliminar foram selecionadas para amostragem, parcelas que apresentavam árvores com sintomatologia compatível com doenças causadas por espécies de *Botryosphaeriaceae* (ramos secos, cancrios, dieback, feridas e presença de frutificações).

Em cada parcela, foram marcadas pelo menos 10 árvores que apresentavam variados graus de desfolha, seguindo a metodologia descrita em Cadahia *et al.* (1991).

Foram obtidas as coordenadas geográficas através de Sistemas de Posicionamento Global (GPS) e com base nesses dados foram criados num Sistema de Informação Geográfica (SIG), mapas (ESRI, 2014) com a georreferenciação das parcelas selecionadas para cada um dos hospedeiros.

Em cada árvore marcada recolheu-se uma amostra constituída por material vegetal proveniente de ramos e/ou do tronco (figura 2).

As amostras depois de recolhidas e acondicionadas em sacos de papel, foram colocadas em sacos de plástico e guardadas numa mala térmica até chegarem ao laboratório.

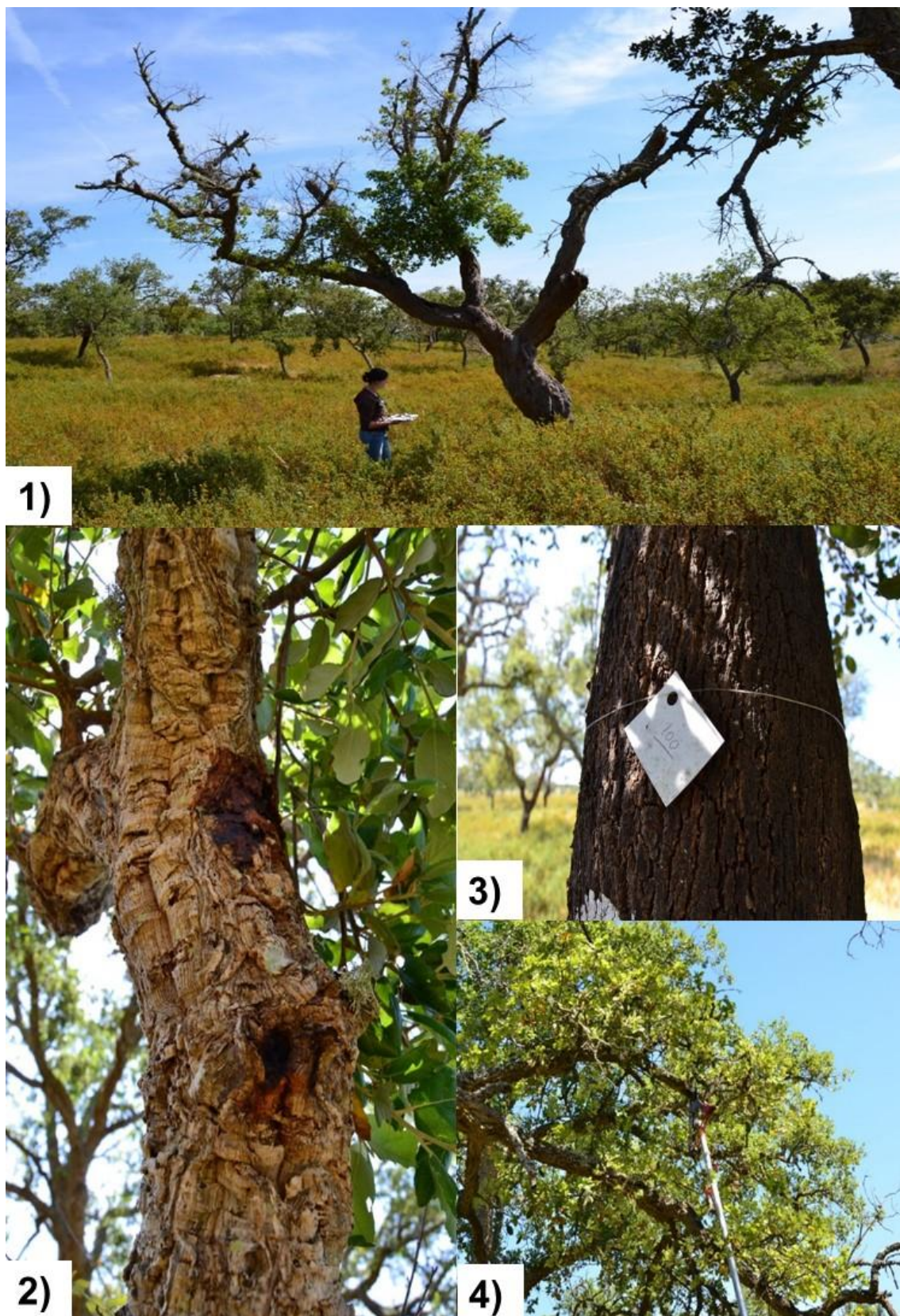


Figura 2- Prospeção e recolha de amostras. 1 e 2) sobreiros com sintomatologia. 3) exemplo de marcação e 4) recolha de ramos. (Fotos da autora e Helena Bragança)

2.2. Processamento de amostras para isolamento de fungos

O material vegetal constituente das amostras foi observado a olho nu e à lupa binocular para pesquisa de estruturas fúngicas. Nas amostras em que foram observadas frutificações, recolheram-se pedaços de material vegetal contendo frutificações para placas de Petri estéreis que foram colocadas no fluxo laminar onde se procedeu à transferência de esporos (conídios e/ou ascósporos) com a ajuda de bisturi para placas de Petri (9 cm Ø) contendo 15 mL de meio de cultura (PDA - Agar de Batata Dextrosada diluído em 50%, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com Sulfato de estreptomicina (500 µg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para evitar o crescimento de bactérias. Das amostras onde não foram observadas frutificações, foram retirados fragmentos de aproximadamente 2 x 2 mm, da zona de interceção necrose/tecido são, para isolamento de fungos.

Nos casos de tronco e pernadas grossas com sintomatologia foram cortadas rodela para posterior observação e recolha de fragmentos das necroses internas (figura 3).

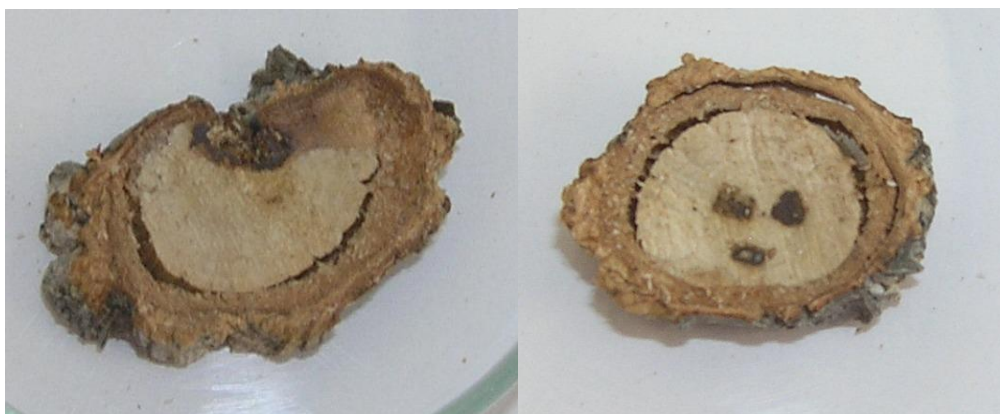


Figura 3 -Exemplos de necroses internas (Fotos da autora)

Os fragmentos foram sujeitos a uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a 1,75% durante 1 minuto, passados duas vezes por água estéril para eliminação do reagente e colocados posteriormente em papel de filtro estéril para absorção do excesso de água. Os fragmentos de material foram colocados em placas de Petri estéreis e na câmara de fluxo laminar procedeu-se ao seu plaqueamento para placas de Petri contendo meio de cultura, de acordo com o método acima descrito para os esporos.

Após identificação (o nome da amostra, meio de cultura usado e data do isolamento) as placas, seladas com “Parafilm”, foram a incubar no escuro em estufa de incubação à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante aproximadamente uma semana.

Após obtenção de crescimento fúngico observaram-se as características morfológicas das culturas obtidas e repicaram-se para PDA as que eram compatíveis com fungos da família Botryosphaeriaceae. Do mesmo modo foram repicadas nas mesmas condições outras culturas suspeitas de serem fungos patogênicos para os hospedeiros.

Para se conservar as diferentes culturas, estas foram repicadas para frascos McCartney com meio sintético de Agar inclinado (SNA - Synthetic Nutrient Agar) e após o crescimento das culturas os frascos foram conservados a 4°C . Paralelamente foram cortados pedaços de PDA colonizados da periferia de uma cultura fresca de cada fungo (de aproximadamente $2 \times 2\text{cm}$) que se colocaram em frascos com água estéril para serem conservados igualmente a 4°C .

2.3. Identificação específica

Para a identificação específica recorreu-se numa primeira fase à caracterização morfológica, no entanto como as espécies da família Botryosphaeriaceae são difíceis de identificar apenas com base nas características morfológicas, foi igualmente necessário o uso de métodos moleculares complementares para obtenção de uma confirmação específica.

2.3.1. Com base em características morfológicas

2.3.1.1. Morfologia da cultura

Observaram-se as características morfológicas das culturas a olho nu e com recurso a lupa binocular e procedeu-se à observação microscópica de preparações em lâmina /lamela. Compararam-se todas as culturas segundo a forma de crescimento em meio de cultura (PDA/ PDA a 50%), a evolução na cor dos micélios ao longo do período de crescimento (frente e verso da placas) e as características do micélio (existência ou não de micélio aéreo, maior ou menor velocidade de crescimento). Foram constituídos agrupamentos de isolados com características similares para posterior observação dos esporos de culturas representativas destes grupos.

2.3.1.2. Identificação a partir das características dos esporos

Para a obtenção de esporos dos isolados representativos dos agrupamentos selecionados com base na morfologia da cultura foi induzida a frutificação do fungo através da sua inoculação em material vegetal. No fluxo laminar, coloraram-se pedaços de agulhas de pinheiro esterilizadas na superfície de placas de Petri (5,5 cm Ø) contendo Agar a 1 %, (um pedaço no meio de cada placa). Um pedaço de cerca de 2 x 2 mm de diâmetro foi retirado de culturas em crescimento ativo (em meio de PDA) e colocou-se perto da agulha com a parte do micélio aéreo virado para baixo. Depois de seladas com “Parafilm” as placas foram colocadas a incubar no escuro em estufa de incubação à temperatura de 24°C durante uma semana. Depois desta primeira semana no escuro as placas foram observadas à lupa binocular, de seguida foram expostas a luz solar e observadas semanalmente na lupa binocular até se conseguir observar esporos dentro das frutificações (figura 4).



Figura 4 – Corte transversal numa frutificação com esporos no seu interior (Foto da autora)

Procedeu-se posteriormente a preparações de esporos em lâminas/lamela com ácido láctico para observação microscópica. Depois de observação em Microscópio Óptico Composto para verificação da qualidade da preparação, a lâmina foi identificada com o nome da amostra e a data, e selada com aplicação de verniz à volta da lamela.

As lâminas foram posteriormente fotografadas em ampliação 600x, os 30 esporos medidos (duas culturas selecionadas no caso dos 2 maiores grupos estabelecido com

base na morfologia da cultura dos isolados) e procedeu-se à análise dos esporos (tamanho, cor e forma).

2.3.2. Molecular

2.3.2.1. Extração de ADN

Para extrair o ADN (Ácido desoxirribonucleico), o micélio cresceu em PDA, cerca de 7 dias no escuro em estufa de incubação à temperatura de 24°C. Foi raspado da superfície de cada colónia uma porção de cerca de 2 x 2 cm de micélio e colocou-se em tubos Eppendorf de 2 mL para a extração do ADN com o Kit “DNA, RNA and Protein Purification - NucleoSpin Plant II” (Macherey-Nagel (MN)), seguindo o protocolo do fabricante com ligeiras modificações tendo por base Bragança *et al.* (2007).

2.3.2.2. Amplificação por reação de PCR - ITS e EF1- α

A partir de Reações em Cadeia de Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) amplificou-se o ADN em duas regiões distintas.

Para amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) dos genes que codificam para o RNA ribossomal utilizou-se o par de “primers” ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') segundo White *et al.* (1990).

Para a amplificação da região do genoma que codifica para parte do Fator de Alongamento, 1-Alfa (EF1- α) utilizou-se o par de “primers” EF1-728F (5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) e EF1-986R (5' TACTTG AAGGAACCCTTACC) segundo Carbone *et al.* (1999).

As reações de PCR foram feitas para um volume final de 25 μ l, contendo a mistura apresentada na Tabela 1 e realizadas num termociclador (MJ Research PTC-100, EUA) nas condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1 -Composição das misturas usadas na amplificação de ADN por PCR

Reagentes	Volumes/reação (µL)	
	ITS	EF1-α
Tampão de Taq(10x)	2,5	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	2	1,25
dNTP's (10 mM)	0,5	1,5
"Primer" (10 µL)	2,5	3
"Primer" (10 µL)	2,5	3
TaqAdn Polimerase (5 U/µL)	0,13	0,3
H2O	13,87	10,25
1% w-1	0	0,2
ADN (diluição de 10x)	1	3
Volume total	25	25

Tabela 2 - Programas de amplificação de PCR utilizados para as duas regiões de ADN diferentes

	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
ITS	Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
	Desnaturação	94 °C	30 seg	30
	Hibridação	55 °C	30 seg	
	Extensão	72 °C	1 min	
	Extensão final	72 °C	7 min	1
EF1-α	Desnaturação inicial	94 °C	5 min	1
	Desnaturação	94 °C	45 seg	40
	Hibridação	52 °C	30 seg	
	Extensão	72 °C	1 min e 30 seg	
	Extensão final	72 °C	7 min	1

Os produtos da amplificação das reações de PCR foram separados por electroforese, em gel de Agarose a 1,2%, em tampão 0,5X TBE (solução tampão Tris/Borato/EDTA) num aparelho de electroforese horizontal (Enduro, Labnet International, EUA) durante 90 minutos a 100V. Para a electroforese foram utilizados 5 µL de cada tubo com produto PCR aos quais se adicionou 1 µL de corante. Como marcador molecular utilizou-se 1 Kb DNALadder (3,5 µL de marcador nos poços que flanqueavam as restantes amostras e o controlo dos produtos PCR).

2.3.2.3. Sequenciação e caracterização filogenética

Após purificação (Kit “DNA, RNA and Protein Purification – NucleoSpin Plant II”) os produtos PCR foram enviados para a empresa STAB-VIDA para sequenciação. As sequências obtidas foram editadas e corrigidas com o programa FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., <http://www.geospiza.com/finchtv>), submetidas a uma análise por BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para a pesquisa de homologias numa base de dados internacional (GenBank - NCBI- National Center for Biotechnology Information).

Os alinhamentos das sequências foram efetuados e ajustados pela utilização do programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999).

As análises filogénicas foram realizadas através do programa MEGA 6 (Tamura, 1992; Tamura *et al.*, 2013). As árvores filogénicas foram obtidas pelo método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo definido pelo critério de informação Bayesiana para cada situação, com 1000 réplicas de “bootstrap”.

2.4. Ensaios de patogenicidade

Para confirmar a patogenicidade das espécies de Botryosphaeriaceae isoladas no âmbito deste trabalho (Postulados de Koch) e testar a sua agressividade nos hospedeiros dos quais foram isolados, foram estabelecidos ensaios de patogenicidade através da inoculação em sobreiros (*Quercus suber*) e eucaliptos (*Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens*) jovens.

Para verificar o potencial que os organismos patogénicos isolados de um dos hospedeiros têm para causar doença no outro hospedeiro foram realizados no âmbito deste trabalho, ensaios de patogenicidade que consistiram na inoculação de plantas

de sobreiro com as espécies de Botryosphaeriaceae isoladas de eucalipto nomeadamente *Neofusicoccum parvum* e *N. eucalyptorum* e paralelamente na inoculação de plantas de eucalipto com *Diplodia corticola*, a espécie mais frequentemente isolada em sobreiro.

2.4.1. Delineamento dos ensaios

Por razões de logística numa primeira fase foram realizados os ensaios de inoculação apenas com plantas de sobreiro utilizando as espécies de Botryosphaeriaceae isoladas nesse mesmo hospedeiro. Foram utilizados dois isolados diferentes de *Diplodia corticola* (CH7 e CH60) por ser uma espécie que já se sabe ser muito agressiva e frequentemente encontrada, um isolado de *Dothiorella* sp. (CH57) e um isolado de *D. quercivora* (CH51), num total de 90 plantas: 20 plantas em cada modalidade inoculada e no controlo e 10 plantas na modalidade inoculada com o isolado de *D. quercivora*.

Numa segunda fase, foram realizados os ensaios em que se testaram as duas espécies de eucalipto mais comuns em Portugal, *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globulus*, com as duas espécies de Botryosphaeriaceae isoladas de eucalipto, *Neofusicoccum parvum* (PE18) e *N. eucalyptorum* (PE139). Neste ensaio foram utilizadas oito plantas de *Eucalyptus nitens* e 10 plantas de *Eucalyptus globulus* em cada modalidade, num total de 24 plantas para o ensaio com *E. nitens* e 30 plantas para o ensaio com *E. globulus*.

Paralelamente efetuaram-se os ensaios para testar os fungos isolados de eucalipto (PE18 e PE139), em plantas de sobreiro (provenientes do mesmo lote das plantas utilizadas no primeiro ensaio), e para testar o fungo *D. corticola* (isolado de sobreiro CH60) nas duas espécies de eucalipto. Nestes ensaios foram utilizadas 10 plantas por modalidade para o caso do sobreiro e *E. globulus* e oito plantas por modalidade no caso de *E. nitens*.

2.4.2. Obtenção das plantas e envasamento

2.4.2.1. Em sobreiros (*Quercus suber*)

Para a realização destes ensaios de patogenicidade, foram recolhidas sementes pelo método de batimento num sobreiro em Alcácer do Sal. Depois de selecionadas as sementes (sem sinais da presença de insetos e/ou fungos), foram colocadas numa

solução de 50% lixívia e 50% água durante 5 minutos (as que flutuaram na solução foram rejeitadas). Cortaram-se as aréolas das sementes e retiram-se as que tinham insetos. De seguida, colocaram-se novamente as sementes na solução por mais 24h.

Paralelamente prepararam-se tabuleiros com areia esterilizada para a sementeira. As bolotas foram colocadas na mesma direção à superfície de uma primeira camada de areia e cobertas depois por outra camada de areia estéril. As sementes foram posteriormente expostas a refrigeração em frigorífico (estratificação) até se verificar o rachamento da semente (o que ocorreu em aproximadamente um mês após a sementeira). As plantas foram envasadas através da utilização de substrato constituído por 2/3 de terra e 1/3 de areia.

2.4.2.2. Em eucaliptos (*Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens*)

No caso dos eucaliptos, foram usadas plantas clonais de seis meses de idade provenientes dos Viveiros do Furadouro Unipessoal Lda. As plantas foram transplantadas das cuvetes originais para vasos nas mesmas condições anteriormente descritas para as plantas de sobreiro e estiveram a aclimatar durante aproximadamente duas semanas.

2.4.3. Inoculação dos fungos

Para a inoculação dos fungos fez-se um pequeno corte superficial no caule de cada planta, com a ajuda de um bisturi esterilizado, à distância de aproximadamente 3 cm do solo, onde foi colocado um quadrado de aproximadamente 5 x 5 mm retirado da periferia da uma cultura de fungo em crescimento ativo (em PDA). Utilizou-se algodão embebido em água estéril a envolver a zona da inoculação e selou-se com “Parafilm” (Figura 5). Nas plantas testemunha procedeu-se da mesma forma com exceção da introdução da cultura de fungo (foi utilizada um quadrado de PDA sem a cultura do fungo). Após uma semana, a película de “Parafilm” foi retirada de cada planta.



Figura 5 – Inoculação de plantas de sobreiro - detalhe onde é visível a proteção da ferida inoculada através do uso de algodão para criar Câmara húmida. (Foto da autora)

O ensaio foi monitorizado semanalmente para observação de sinais e sintomas até 40 dias após a inoculação. Para a verificação dos postulados de Koch, procedeu-se ao re-isolamento dos fungos (metodologia descrita no ponto 2.2) a partir das plantas do ensaio.

2.4.4. Avaliação dos sintomas e Análise estatística

Com base na observação visual das plantas fez-se uma avaliação ao fim de 40 dias após a inoculação com base numa escala de avaliação. Consideraram-se 5 níveis de afetação das plantas, sendo A = planta sem qualquer tipo de sintoma; B = poucas folhas secas; C = metade das folhas secas; D = mais de metade das folhas secas e E = planta totalmente seca.

As variáveis resultantes da experimentação eram do tipo categórico ordinal e sendo as amostras pequenas e de dimensão variável, entre $n = 8$ e $n = 20$, usou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, apropriado para este tipo de dados (Zar, 1989). Contudo, segundo Mehta & Patel (1997), quando se tratam de amostras de tamanho pequeno e desigual, os métodos estatísticos que se baseiam na teoria assintótica poderão não ser válidos e os valores de “p” calculados por estes e pelos métodos exatos poderão ser bastante diferentes e levarem a resultados contraditórios (Mehta & Patel, 1996). Por essa razão, usaram-se testes exatos de permutações completas da

estatística de Kruskal-Wallis, com recursos ao pacote estatístico Statxact® 11 (Cytel Software Corporation© 2015).

3. RESULTADOS

3.1. Prospeção e recolha de amostras

Nos mapas seguintes (figuras 6 e 7), encontram-se georreferenciados as parcelas onde se encontraram espécies de Botryosphaeriaceae, num total de 6 parcelas com sobreiros e 10 com eucaliptos. As parcelas estão assinaladas por concelhos.

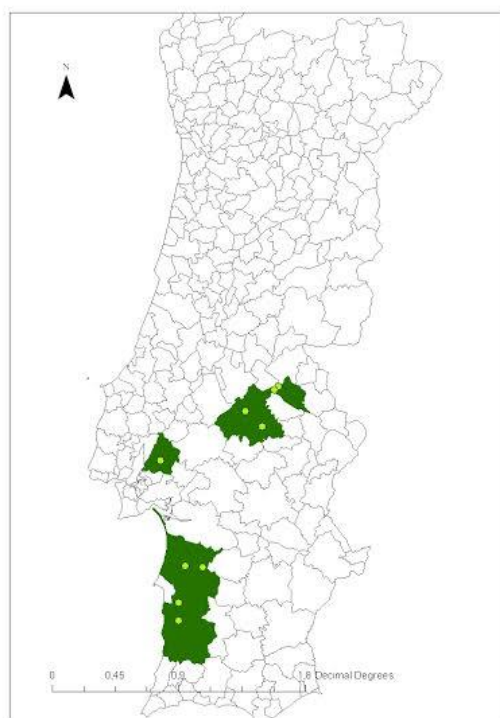


Figura 6 - Mapa das parcelas com sobreiro

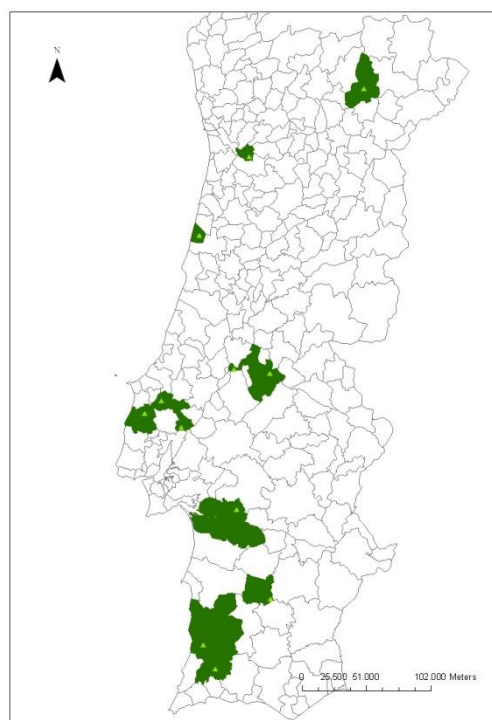


Figura 7 - Mapa das parcelas com eucalipto

3.2. Identificação das amostras

No total, para este trabalho foram obtidos 47 isolados com morfologia compatível com fungos da família Botryosphaeriaceae, dos quais 32 foram provenientes de amostras de sobreiro e os restantes 15 isolados e amostras de eucalipto.

3.2.1. Morfologia

Ao comparar todas estas culturas segundo as características descritas no ponto 2.2.1 dos Materiais e Métodos (crescimento da cultura, cor do micélio e a existência ou não de micélio aéreo), foi possível agrupar as espécies em 5 grupos diferentes. Para o hospedeiro sobreiro foi possível distinguir à partida 3 grupos muito distintos, já para o hospedeiro eucalipto apenas se conseguiu separar em 2 grupos diferentes. Na figura 8 podemos encontrar a morfologia da cultura mais comum nos isolados de sobreiro, e as dos isolados do eucalipto encontram-se na figura 9.

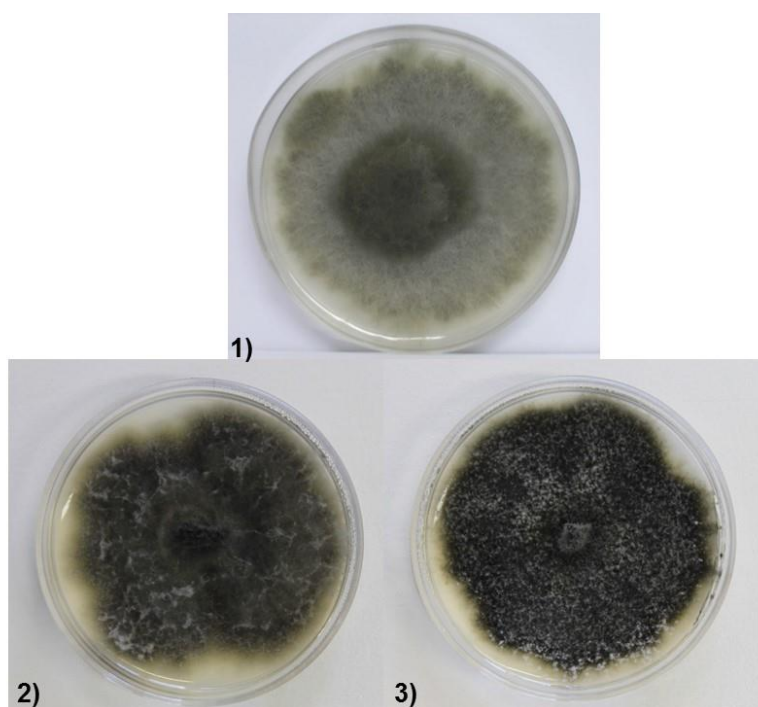


Figura 8 – Morfologia das culturas originária de sobreiro. 1) Isolado CH 60 em PDA, 2) Isolado CH53 em PDA, 3) Isolado CH59 em PDA.

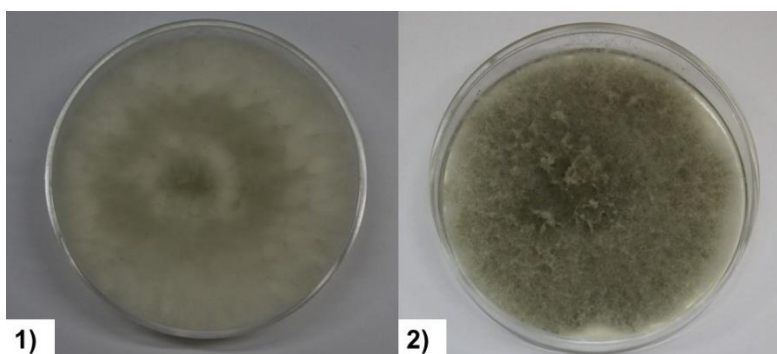


Figura 9 - Morfologias das culturas originárias de eucalipto. 1) Isolado PE18 em PDA, 2) Isolado PE139 em PDA.

Não se conseguiu induzir a formação de nenhuma frutificação em nenhum dos 15 isolados provenientes de eucalipto. Foi observada a formação de frutificações (picnídios) nos isolados de sobreiro, estando na tabela 3 o resultado da medição de 30 esporos provenientes de cada uma das 5 culturas. A figura 10 retrata o processo na obtenção de esporos.

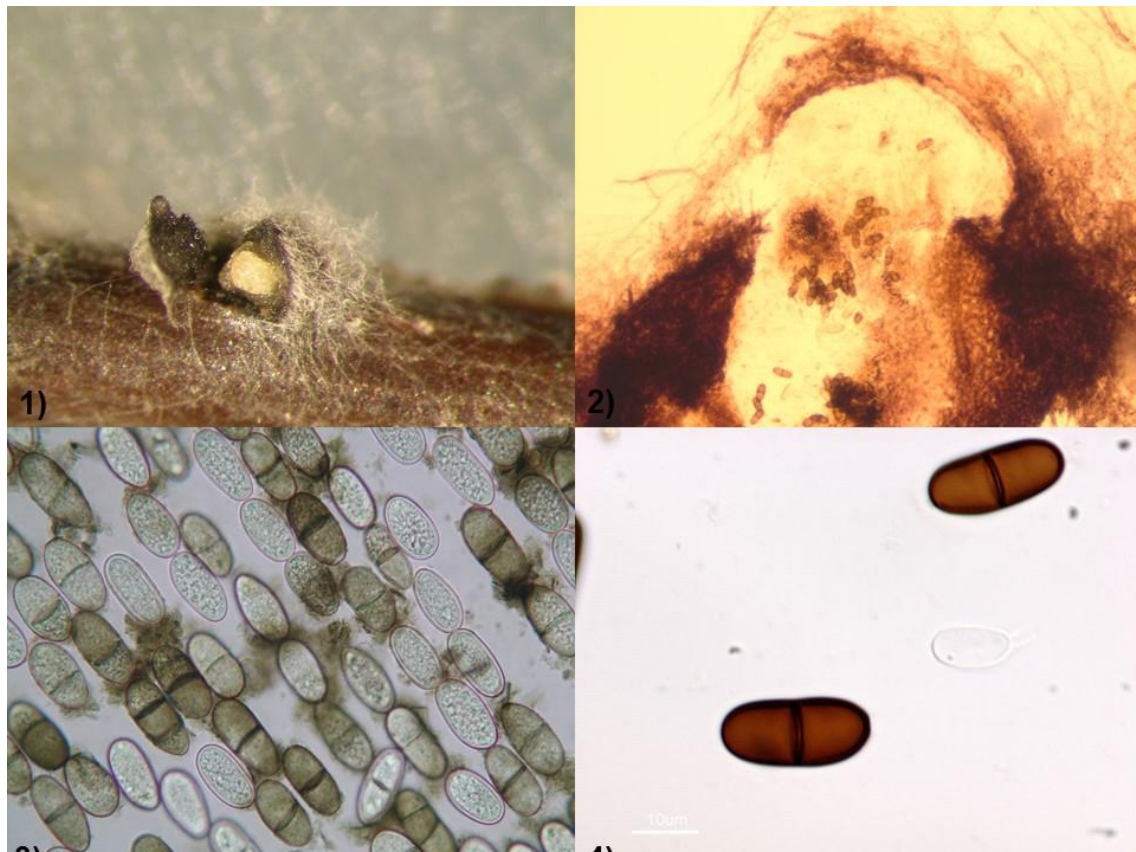


Figura 10 – Processo de obtenção de esporos. 1) corte de um picnídios à lupa), 2) corte de um picnídios ao microscópio, 3 e 4) exemplos de morfologia de esporos

Tabela 3 - Medidas dos conídios

Isolado	Intervalo de confiança a 95% (n = 30 conídios)	Média ± Desvio Padrão	Razão comp/larg
CH50	(27-) 31,88 - 33,46 (-37,32) x (14,58-) 16,28 - 17,32 (-20,72) µm	32,67 ± 2,2 x 16,80 ± 1,45	1,94
CH51	(26,63-) 29,27 - 30,46 (-34,02) x (10,17-) 11,64 - 12,19 (-14) µm	29,86 ± 1,66 x 11,91 ± 0,76	2,51
CH53	(17,17-) 21,11 - 24,61 (-29,78) x (9,08-) 10,85 - 11,91 (-13,98) µm	22,86 ± 4,89 x 11,38 ± 1,48	2,01
CH55	(24,31-) 28,32 - 29,76 (-33,69) x (11,23-) 12,51 - 13,38 (-16,61) µm	29,04 ± 2,02 x 12,94 ± 1,21	2,24
CH57	(19,78-) 21,78 - 22,92 (-25,78) x (8,67-) 9,41 - 9,76 (-10,67) µm	22,35 ± 1,61 x 9,5 ± 0,5	2,35
CH62	(30,12-) 32,66 - 34,92 (-44,3) x (13,75-) 15,39 - 16,66 (-21,63) µm	33,79 ± 3,17 x 16,02 ± 1,78	2,11

3.2.2. Identificação molecular

Depois da obtenção de sequências de ITS e EF1- α e de uma pesquisa por Blast com recurso a dados do GenBank, foram geradas 4 árvores filogenéticas, 2 árvores para cada hospedeiro, uma contendo a análise das sequências de ITS e a outra com os resultados da análise de EF1- α .

As sequências das espécies para comparação foram escolhidas tendo por base Phillips *et al.* (2013).

As árvores filogenéticas referentes ao sobreiro encontram-se desde a figura 11 até à figura 12, as árvores filogenéticas referentes ao eucalipto da figura 13 à 14.

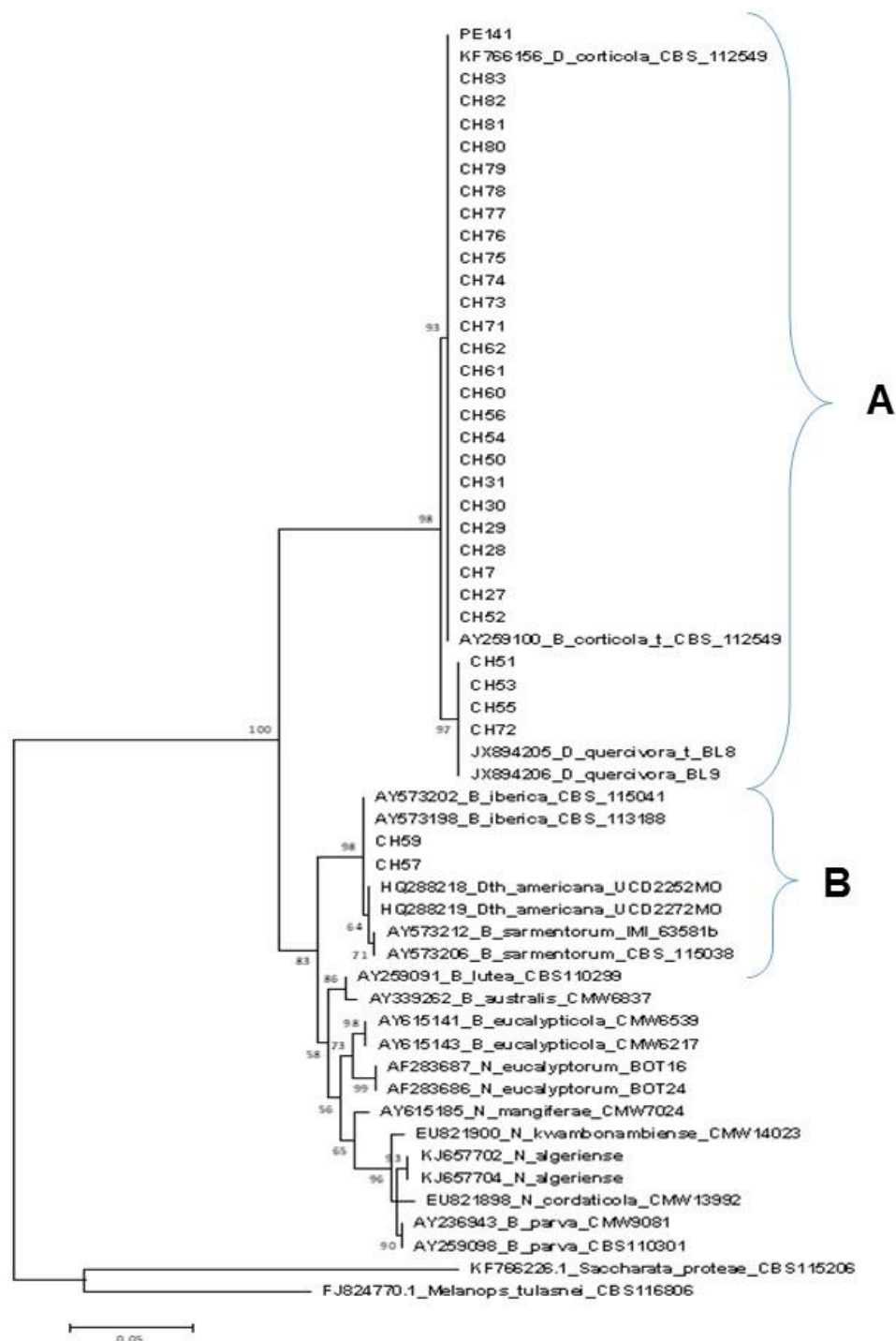


Figura 11 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 32 sequências de ITS de isolados de sobreiro (*Quercus suber*), como resultado de uma análise de Máxima Verosimilhança (Likelihood method) baseada no 2º parâmetro do modelo de Kimura (1980) de um alinhamento de 429 pares de bases de nucleótidos em 1000 réplicas de “bootstrap”. Os números dos ramos correspondem aos valores de “bootstrap” superiores a 0,5. As análises foram realizadas em MEGA6

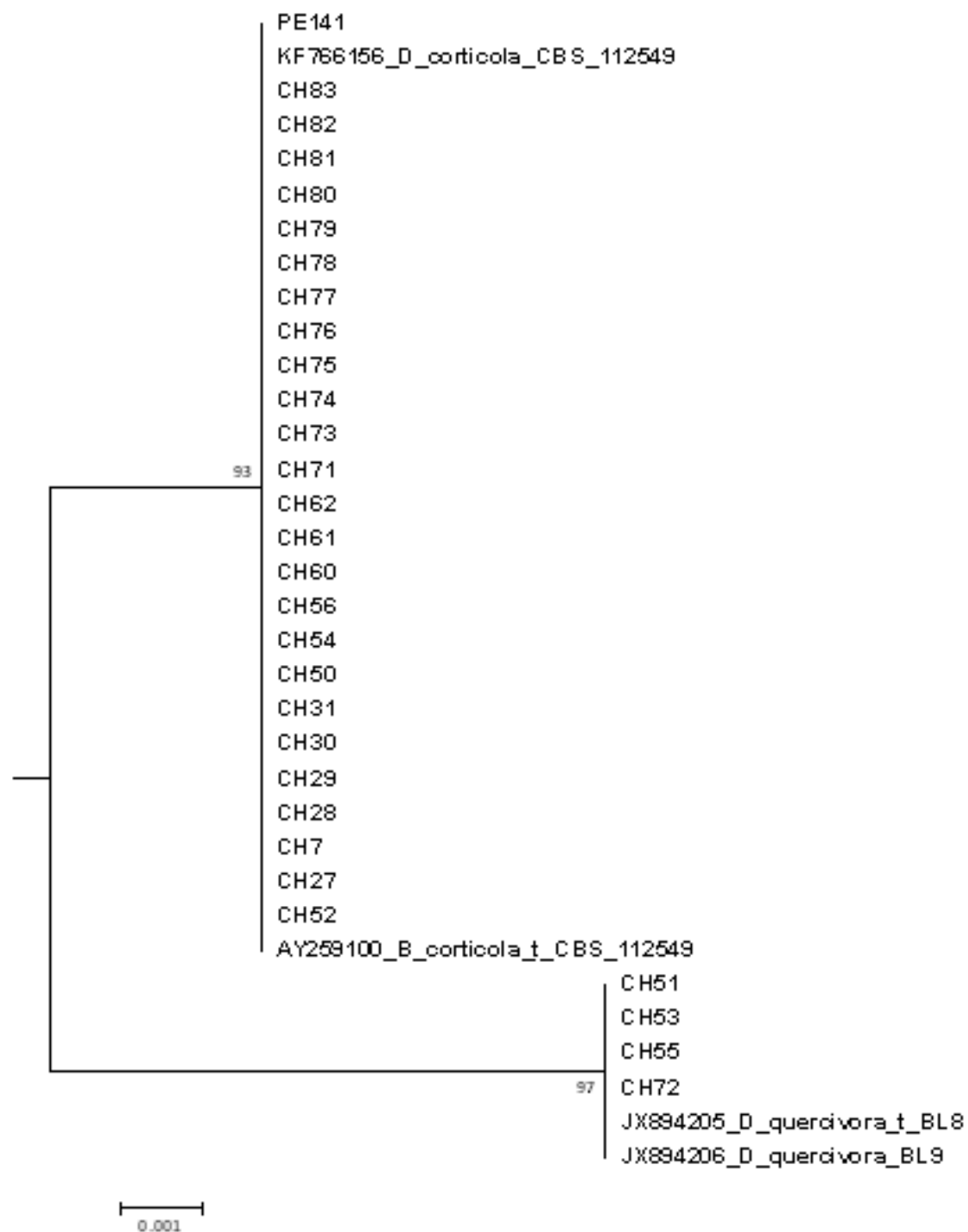


Figura 11 (continuação) - Pormenor A da Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 32 sequências de ITS de isolados de sobreiro (*Quercus suber*).

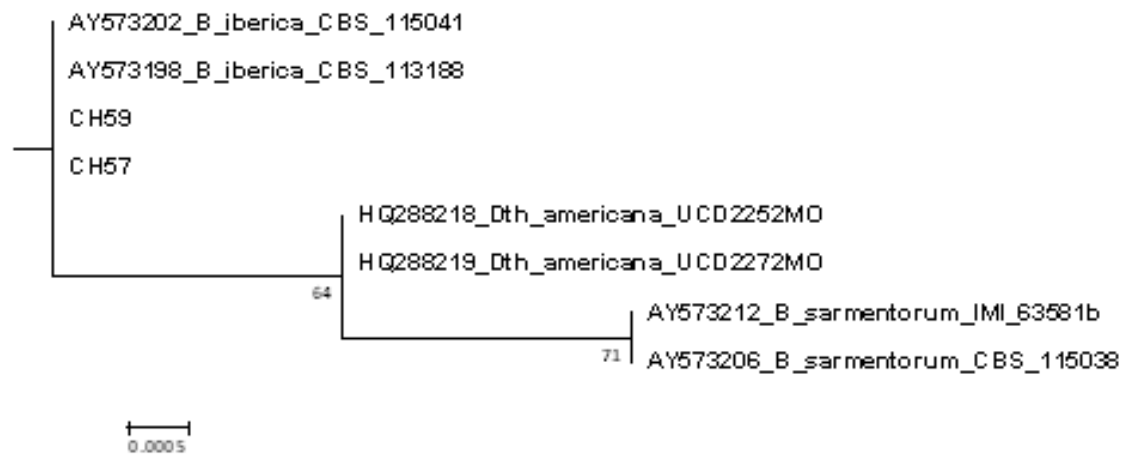


Figura 11 (continuação) - Pormenor B da Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 32 sequências de ITS de isolados de sobreiro (*Quercus suber*).

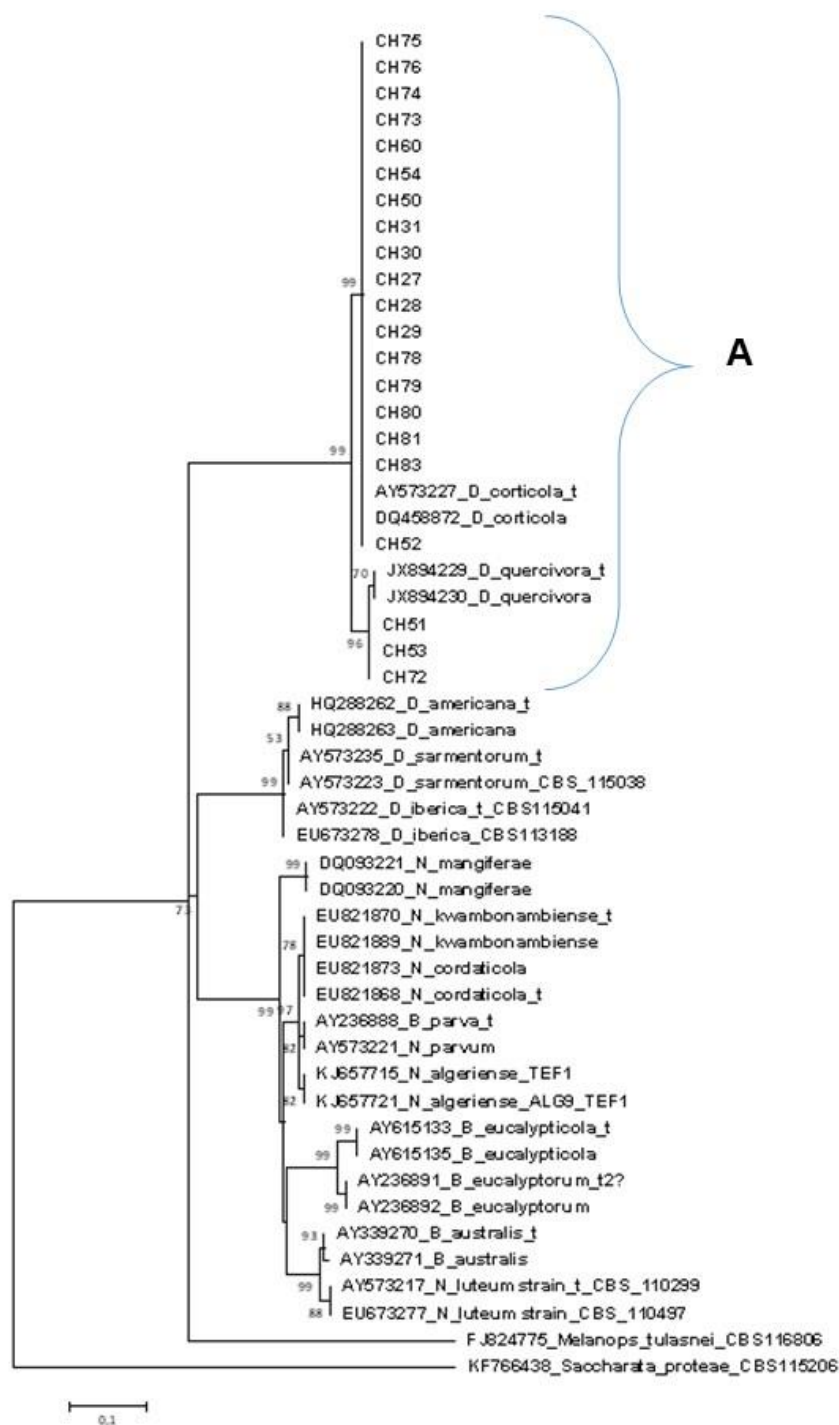


Figura 12 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 21 sequências de EF1- α de isolados de sobreiro (*Quercus suber*), como resultado de uma análise de Máxima Verossimilhança (Likelihood method) baseada no 3º parâmetro do modelo de Tamura (1992) de um alinhamento de 163 pares de bases de nucleótidos em 1000 réplicas de “bootstrap”. Os número dos ramos correspondem aos valores de “bootstrap” superiores a 0,5. As análises foram realizadas em MEGA6.

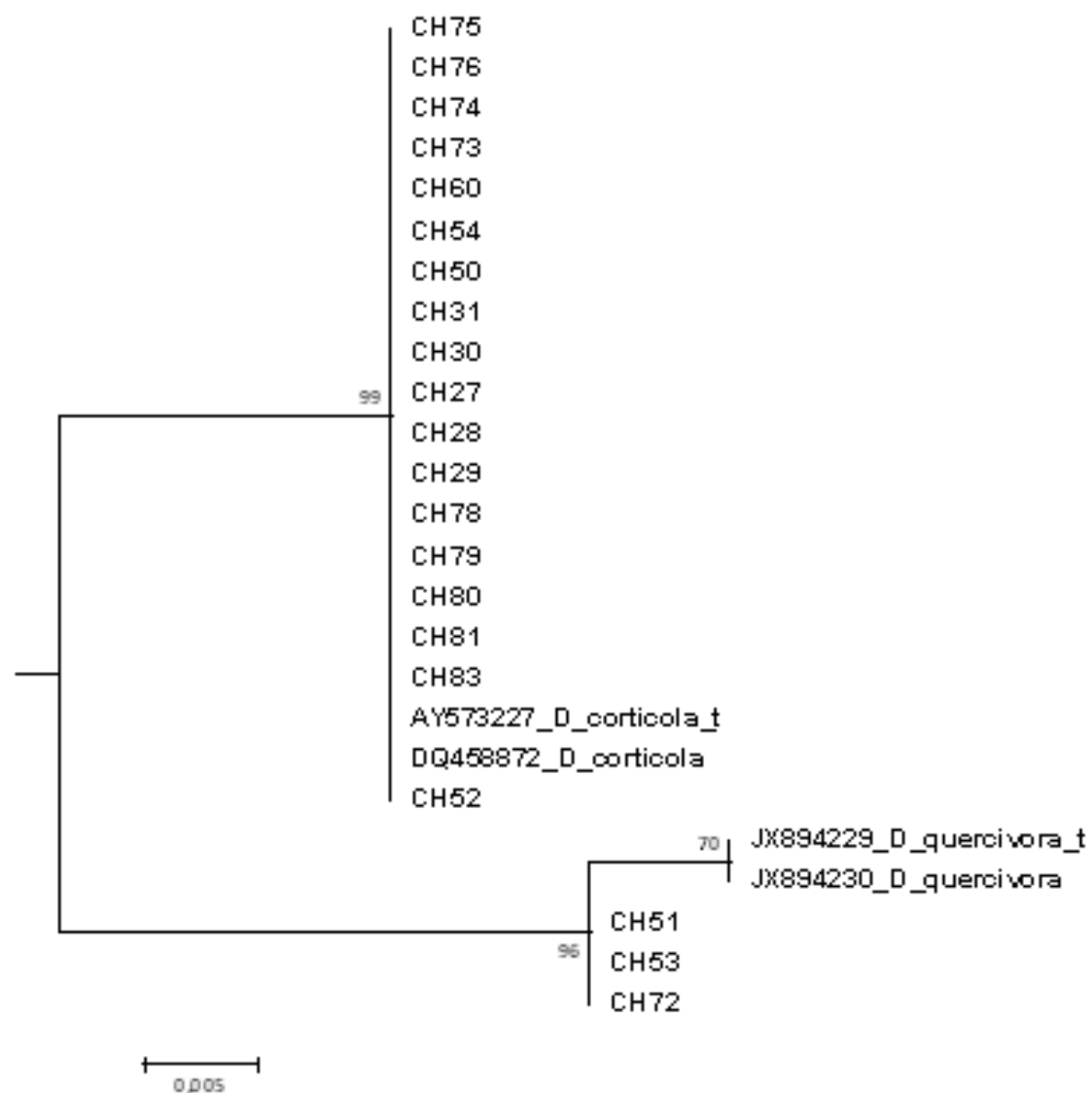


Figura 12 (continuação) - Pormenor A da Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 21 sequências de EF1- α de isolados de sobreiro (*Quercus suber*).

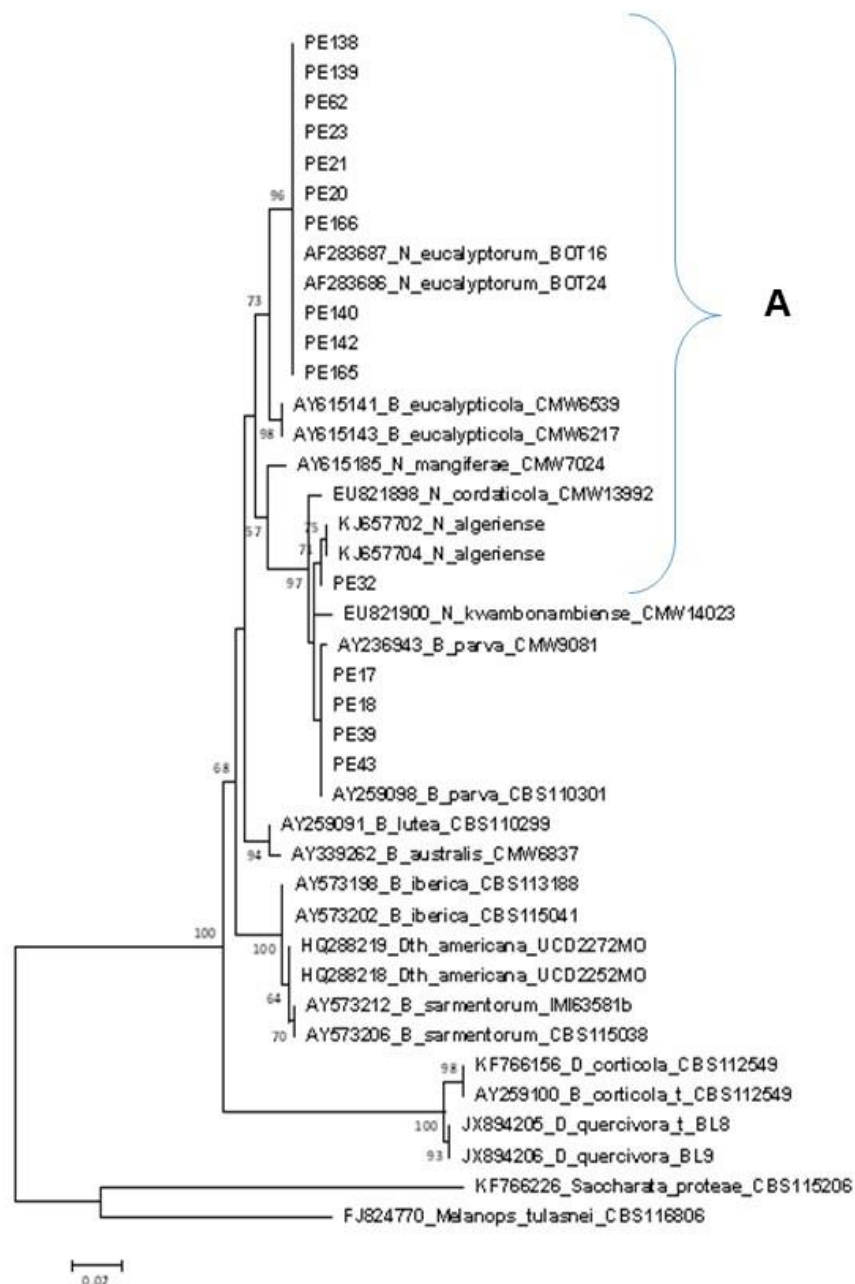


Figura 13 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 15 sequências de ITS de isolados de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), como resultado de uma análise de Máxima Verosimilhança (Likelihood method) baseada no 2º parâmetro do modelo de Kimura (1980) de um alinhamento de 438 pares de bases de nucleótidos em 1000 réplicas de “bootstrap”. Os número dos ramos correspondem aos valores de “bootstrap” superiores a 0,5. As análises foram realizadas em MEGA6

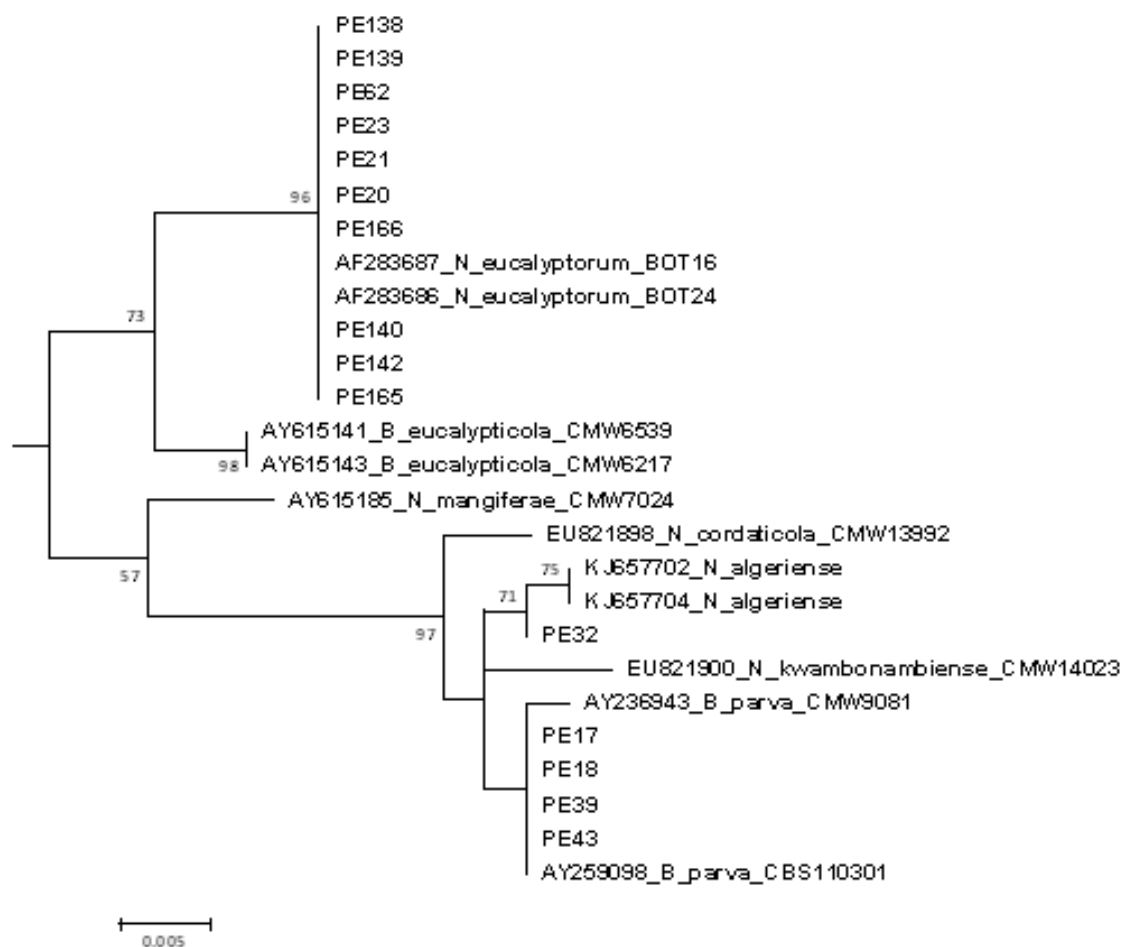


Figura 13 (continuação) - Pormenor A da Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 15 sequências de ITS de isolados de eucalipto (*Eucalyptus globulus*).



Figura 14 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 10 seqüências de EF1- α de isolados de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), como resultado de uma análise de Máxima Verossimilhança (Likelihood method) baseada no 3º parâmetro do modelo de Tamura (1992) de um alinhamento de 166 pares de bases de nucleótidos em 1000 réplicas de “bootstrap”. Os número dos ramos correspondem aos valores de “bootstrap” superiores a 0,5. As análises foram realizadas em MEGA6.

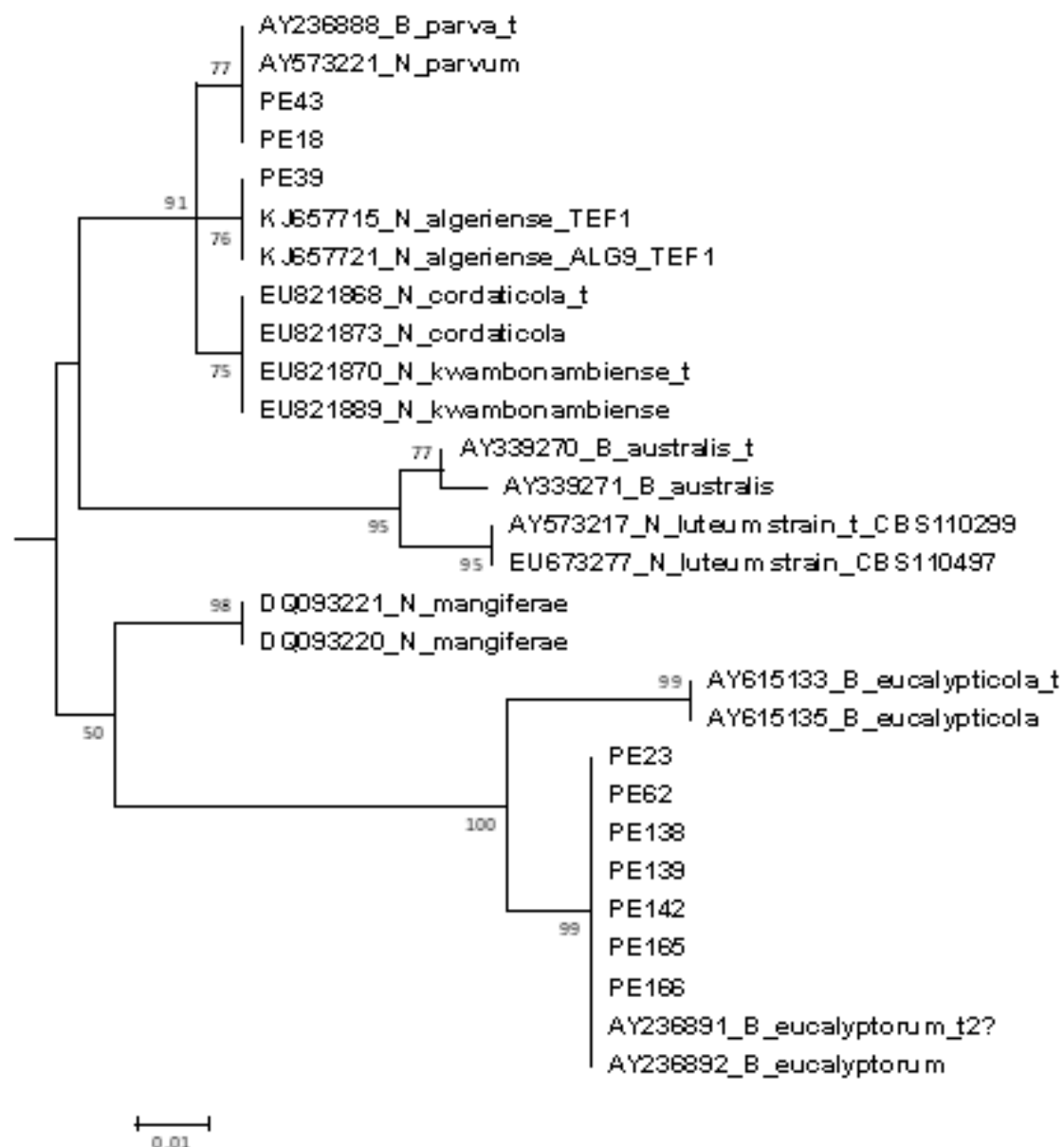


Figura 14 (continuação) - Pormenor A da Árvore filogenética representativa das relações evolutivas de 10 sequências de EF1- α de isolados de eucalipto (*Eucalyptus globulus*).

Após análise de todos os resultados obtidos através dos métodos clássicos e biomoleculares desenvolvidos no âmbito deste trabalho, foi possível elaborar as tabelas resumo 4 e 5. Na tabela 4, consta o resumo dos dados obtidos para os isolados de sobreiro e na tabela 5 encontra-se o resumo dos dados dos isolados de eucalipto. No campo da identificação final foram considerados o conjunto de sequências ITS e EF1- α de cada um dos isolados, à falta de uma destas sequências chegou-se apenas ao género.

Foi confirmada a existência de 5 espécies de Botryosphaeriaceae nos isolados estudados em ambos os hospedeiros.

Em sobreiro foram identificadas 3 espécies - *Diplodia corticola*, *D. quercivora* e *Dothiorella* sp. e em eucalipto 2 espécies - *Neofusicoccum eucalyptorum* e *N. parvum*.

Tabela 4- Tabela resumo dos isolados de Botryosphaeriaceae obtidos em sobreiro

Isolado	Data	Local (Concelho)	Coletor	Morfologia	ITS	EF1- α	Identificação Final
CH7	2011	Grandola	H.Bragança	*	*		<i>Diplodia</i> sp.
CH27	2014	Ponte de Sor	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH28	2014	Ponte de Sor	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH29	2014	Ponte de Sor	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH30	2014	Ponte de Sor	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH31	2014	Ponte de Sor	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH50	2014	Santiago do Cacém	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH51/MEAN_1016	2014	Grandola	H.Bragança	*	KU311197**	KU311200**	<i>Diplodia quercivora</i>
CH52	2014	Grandola	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH53/MEAN_1017	2014	Grandola	H.Bragança	*	KU311198**	KU311201**	<i>Diplodia quercivora</i>
CH54	2014	Grandola	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH55	2014	Grandola	H.Bragança	*	*		<i>Diplodia</i> sp.
CH56	2014	Grandola	H.Bragança	*	*		<i>Diplodia</i> sp.
CH57	2014	Crato	H.Bragança	*	*		<i>Dothiorella</i> sp.
CH59	2014	Crato	H.Bragança	*	*		<i>Dothiorella</i> sp.
CH60	2014	Crato	H.Bragança	*	*	*	<i>Diplodia corticola</i>

* assinala a metodologia utilizada na identificação do isolado; **nº de acesso no GenBank

Tabela 4 (continuação) - Tabela resumo dos isolados de Botryosphaeriaceae obtidos em sobreiro

Isolado	Data	Local (Concelho)	Coletor	Morfologia	ITS	EF1- α	Identificação Final
CH61	2014	Crato	H.Bragança		*		<i>Diplodia</i> sp.
CH62	2014	Crato	H.Bragança		*		<i>Diplodia</i> sp.
CH71	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		*		<i>Diplodia</i> sp.
CH72/MEAN_1018	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		KU311199**	*	<i>Diplodia quercivora</i>
CH73	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH74	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH75	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH76	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH77	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		*		<i>Diplodia</i> sp.
CH78	2014	Grandola	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH79	2014	Benavente	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH80	2014	Benavente	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH81	2014	Benavente	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
CH82	2014	Benavente	H.Bragança/ J.Neno		*		<i>Diplodia</i> sp.
CH83	2014	Benavente	H.Bragança/ J.Neno		*	*	<i>Diplodia corticola</i>
PE141	2012	Odemira	H.Bragança/E.Diogo		*		<i>Diplodia</i> sp.

* assinala a metodologia utilizada na identificação do isolado; **nº de acesso no GenBank

Tabela 5 -Tabela resumo dos isolados obtidos em hospedeiro eucalipto

Isolado	Data	Local (Concelho)	Coletor	Morfologia	ITS	EF1- α	Identificação Final
PE 17	2011	Alcácer do Sal	H.Bragança/ E.Diogo		*		<i>Neofusicoccum</i> sp.
PE 18	2011	Alcácer do Sal	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum parvum</i>
PE20	2011	Alcácer do Sal	H.Bragança/ E.Diogo		*		<i>Neofusicoccum</i> sp.
PE21	2011	Alcácer do Sal	H.Bragança/ E.Diogo		*		<i>Neofusicoccum</i> sp.
PE23	2011	Évora	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>
PE32	2010	Torres Vedras	H.Bragança/ E.Diogo		*		<i>Neofusicoccum</i> sp.
PE39	2011	Cadaval	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum parvum</i>
PE43	2012	Vila Nova da Barquinha	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum parvum</i>
PE 62	2012	Castelo de Paiva	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>
PE138	2012	Aljustrel	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>
PE139	2012	Odemira	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>
PE140	2012	Odemira	H.Bragança/ E.Diogo		*		<i>Neofusicoccum</i> sp.
PE142	2012	Monchique	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>
PE165	2013	Mirandela	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>
PE166	2013	Mirandela	H.Bragança/ E.Diogo		*	*	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>

3.3. Ensaio de Patogenicidade

No Anexo I encontra-se a tabela com o registo de todas as observações feitas no decorrer dos 40 dias dos ensaios de patogenicidade.

No Anexo II encontra-se a tabela com os resultados da análise estatística dos dados obtidos após os 40 dias dos ensaios de patogenicidade aos 40 dias

3.3.1. Testes de patogenicidade – Postulados de Koch

3.3.1.1. Sobreiro - Patogenicidade das espécies de Botryosphaeriaceae isoladas em sobreiro: *Diplodia corticola*; *D. quercivora* e *Dothiorella* sp.

Os resultados de inoculação com os isolados selecionados para os ensaios de patogenicidade em sobreiro, CH7 e CH60 de *Diplodia corticola*, CH51 de *D. quercivora* e CH57 de *Dothiorella* sp. revelaram que após os 40 dias que durou o ensaio:

- *Dothiorella* sp.: nenhuma das plantas apresentou qualquer sintoma;
- *D. quercivora*: 50% das plantas não apresentavam qualquer sintoma e apenas 20% das plantas estavam secas;
- *D. corticola* com o isolado CH60 todas as plantas secaram; com o isolado CH7, 75% das plantas secaram e apenas uma planta não apresentou qualquer sintoma;
- Testemunha: nenhuma das plantas apresentava qualquer sintoma.

Foram confirmados os postulados de Koch nas plantas sintomáticas.

O tratamento estatístico dos dados permitiu verificar que existem diferenças muito significativas quando se comparam os efeitos dos quatro isolados- CH7, CH60, CH51 e CH57- testados no sobreiro ($H = 144,677$; gl: 3; $p < 0,001$).

Quando se compararam os dois isolados da espécie *D. corticola* entre si (CH7 e CH60), apesar do teste revelar diferença significativa ($p = 0,0471$) este valor encontra-se muito perto do nível de significância $\alpha = 0,05$ que determina a rejeição ou não, da hipótese nula. Ambos os isolados (CH60 e CH7) são muito agressivos, quando comparados com a testemunha ($p < 0,01$). O isolado da espécie *D. quercivora* (CH51) também apresenta diferenças significativas quando comparado com a

testemunha ($H = 11,6$; $gl: 2$; $p < 0,01$) mas foi significativamente menos agressivo para as plantas do que os isolados da espécie *D. corticola*.

O isolado CH57, de *Dothiorella iberica* não teve um comportamento de patógeno uma vez que nenhuma planta apresentou sintomas nas condições do ensaio.

3.3.1.2. Eucalipto – Patogenicidade das espécies de Botryosphaeriaceae isoladas em eucalipto: *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum eucalyptorum*

Os resultados da inoculação de plantas de *Eucalyptus globulus* e *E. nitens* com os isolados das espécies *Neofusicoccum parvum* e *N. eucalyptorum*, respetivamente PE18 e PE139, isoladas de eucalipto, revelaram que após os 40 dias que durou o ensaio:

- *N. parvum*: Todas as plantas de *E. nitens* apresentavam algum tipo de sintomas ou estavam secas (87% das plantas estavam secas); 90% das plantas de *E. globulus* apresentavam sintomas (30% estavam secas);
- *N. eucalyptorum*: 88% das plantas de *E. nitens* apresentavam algum tipo de sintomas (25% estavam secas); 20% das plantas de *E. globulus* apresentavam alguma sintomatologia não havendo nenhuma planta completamente seca no final do ensaio;
- Testemunha: nenhuma das plantas apresentava qualquer sintoma.

Foram confirmados os postulados de Koch nas plantas sintomáticas.

O tratamento estatístico dos dados mostrou que ambas as espécies de eucalipto se mostraram significativamente mais afetadas por *N. parvum* do que por *N. eucalyptorum* ($p < 0,05$). No caso de *E. globulus* os resultados revelaram que com a espécie *N. eucalyptorum* não houve sequer diferenças significativas comparando com a testemunha.

Comparando as duas espécies de eucalipto, *E. nitens* comportou-se como sendo significativamente mais sensível do que *E. globulus* para ambos os isolados testados ($p < 0,05$).

3.3.2. Testes de patogenicidade – Inoculações cruzadas

3.3.2.1. Efeito no sobreiro das espécies de Botryosphaeriaceae mais frequentemente isoladas do eucalipto - *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum eucalyptorum*

Quando comparados os resultados 40 dias após a inoculação, 80% das plantas inoculadas com *Neofusicoccum parvum* (PE18) estavam secas e nenhuma planta secou na modalidade inoculada com *N. eucalyptorum* (PE139). Com este fungo, 80% das plantas não apresentavam sequer alguma sintomatologia. Nenhuma das plantas do controlo apresentava qualquer sintoma ao fim dos 40 dias.

O tratamento estatístico dos dados permitiu verificar diferenças altamente significativas na forma como os dois fungos afetaram as plantas de sobreiro ($p < 0,001$), sendo a espécie *N. parvum* bastante mais agressiva para o sobreiro do que a espécie *N. eucalyptorum*. Verificou-se também que *N. parvum* é igualmente agressivo para o *E. nitens* e para o sobreiro, uma vez que não houve diferenças significativas entre os resultados daquelas modalidades.

Com o fungo da espécie *N. eucalyptorum*, verificou-se uma diferença altamente significativa ($p < 0,001$) quando se comparam os resultados entre sobreiro e *E. nitens*. Este fungo praticamente não afetou o sobreiro nas condições do ensaio, não havendo sequer diferenças significativas quando se compara com a testemunha ($H = 12,111$; gl: 2; $p > 0,10$), ao contrário do que acontece com a espécie *N. parvum* em que há diferenças altamente significativas quando comparados os resultados com os da testemunha ($p < 0,001$).

Quando comparados os efeitos das duas espécies isoladas do eucalipto (*N. parvum* e *N. eucalyptorum*), com a espécie isolada de sobreiro (*D. corticola*), e considerada mais agressiva para este hospedeiro, o tratamento estatístico dos dados revelou que as espécies isoladas do eucalipto foram significativamente menos agressivas para o sobreiro nas condições do ensaio.

3.3.2.2. Efeito em *Eucalyptus globulus* e *E. nitens* da espécie de Botryosphaeriaceae isolada de sobreiro - *Diplodia corticola*

Os resultados após os 40 dias revelaram que o fungo *Diplodia corticola* (CH60) não causou qualquer sintoma nas plantas de *E. globulus*.

As plantas de *E. nitens*, no período de tempo estabelecido para o decurso da experiência, comportaram-se com maior sensibilidade à ação do fungo, uma vez que se observaram sintomas em mais de 50% das plantas, ainda que na maior parte dos casos muito ligeiros. O tratamento estatístico dos dados revelou diferenças significativas ($H = 6,818$; $df = 2$; $p < 0,05$) na comparação com o controlo.

Comparando estatisticamente o efeito do fungo nas duas espécies de eucalipto, em *E. nitens* houve uma maior reação à ação de *D. corticola* do que em *E. globulus*, uma vez que o teste revelou diferenças muito significativas entre as duas modalidades

Quando comparados os efeitos de *D. corticola* com o das outras duas espécies isoladas do eucalipto, *N. parvum* e *N. eucalyptorum*, o tratamento estatístico dos dados revelou que no caso de *E. nitens* há diferenças muito significativas quando se analisam as três modalidades em simultâneo ($H = 12,00$; $df = 3$; $p < 0,01$). Quando se compararam cada uma das três modalidades com a testemunha verificou-se que as três espécies provocavam sintomas diferenciados em *E. nitens* ($p < 0,05$): *D. corticola* afetou muito pouco ($H = 6,818$; $df = 2$; $p < 0,05$), *N. eucalyptorum* teve um efeito intermédio ($H = 11,67$; $df = 3$; $p < 0,01$) e *N. parvum* revelou as maiores diferenças relativamente ao controlo ($H = 15,00$; $df:2$; $p < 0,001$). Na comparação a pares os efeitos de *D. corticola* e de *N. eucalyptorum* não deram mesmo diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$), ao contrário do que aconteceu quando se comparou *D. corticola* com *N. parvum* em que existiram diferenças muito significativas ($H = 11,72$; $df = 3$; $p < 0,01$).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Relativamente à identificação das espécies da família Botryosphaeriaceae que foram isoladas no âmbito deste trabalho refere-se que sua identificação específica só foi possível pela conjugação dos métodos baseados nas características morfológicas e análise molecular. A família Botryosphaeriaceae compreende uma grande diversidade morfológica e já Phillips *et al.* (2013) consideram que só com base em características morfológicas é muito difícil definir géneros ou mesmo identificar espécies.

Neste trabalho o agrupamento dos isolados com base na morfologia das culturas foi um ponto de partida que permitiu perceber que provavelmente se estaria em presença de várias espécies nos hospedeiros prospetados num total de 16 parcelas em estudo. Agruparam-se os isolados em 3 e 2 grupos distintos, 3 grupos pertenciam as espécies isoladas de sobreiro e 2 grupos às isoladas de eucaliptos, no entanto o tamanho dos esporos para os vários grupos não permitiu confirmar diferentes espécies visto que as diferenças não eram relevantes. Para além de que no caso do eucalipto não foi possível a sua obtenção. A dificuldade em induzir a produção de esporos (frutificações) em material vegetal (em agulha) dos isolados encontrados em eucalipto têm sido também notada por outros investigadores portugueses com trabalhos incidentes dentro da mesma linha de investigação (Artur Alves -Comunicação pessoal).

Phillips *et al.* (2013) já tinham referido que tendo só em conta a medição dos esporos, uma identificação específica dentro desta família não é possível, pois o tamanho dos esporos é muito variado entre géneros e espécies.

Os dados gerados pela análise das sequências obtidas das regiões de ITS e EF1- α dos 47 isolados diferentes, 32 isolados de sobreiro e 15 de eucalipto permitiram a confirmação da existência de 3 espécies diferentes em sobreiro e outras 2 espécies em eucalipto.

Das 3 espécies identificadas em sobreiro, *Diplodia corticola* já era uma espécie que se esperava encontrar visto já estar descrita neste hospedeiro em Portugal desde 2004 (Alves *et al.*, 2004). *D. corticola*, tem sido muito associada ao evidente aumento do declínio no montado juntamente com espécies de *Phytophthora* spp., sendo estes organismos considerados como parasitas primários em *Quercus* spp. (Alves *et al.*, 2004; Branco *et al.*, 2014; Linaldeddu *et al.*, 2014). *D. corticola* consegue afetar a planta em diferentes idades e provocar principalmente cancrios, enquanto que *Phytophthora* spp. afeta as raízes finas reduzindo a sua capacidade para absorver água e nutrientes. No entanto a sintomatologia que ambas provocam não é fácil de se

distinguir (Branco *et al.*, 2014; Linaldeddu *et al.*, 2014). De referir que fora do âmbito deste trabalho de mestrado, mas no âmbito do estudo em que ele se enquadra foram recolhidas amostras de solo e raízes para despiste de *Phytophthora* spp nas mesmas parcelas e em algumas delas houve resultados positivos para este organismo.

Foram ainda encontradas mais duas espécies nos isolados de sobreiro, *Diplodia quercivora* e uma outra espécie, do género *Dothiorella* mas apenas representada por dois isolados. Muito relevante é o facto de ter sido a primeira vez em todo o mundo que a espécie *D. quercivora* é detetada em *Quercus suber*. Esta espécie já tinha sido detetada em hospedeiros da mesma família do sobreiro, nomeadamente em *Quercus canariensis* no noroeste da Tunísia (Linaldeddu *et al.*, 2013) e em *Q. virginiana* nos Estados Unidos da América (Dreaden *et al.*, 2014).

O género *Dothiorella* contempla três espécies diferentes *D. americana*, *D. iberica* e *D. sarmentorum*, sendo estas espécies muito próximas quando analisadas as filogenias geradas pela sequências de ITS e EF1- α . (Phillips *et al.*, 2013). No entanto sabe-se também que *D. americana* é a espécie que tem os conídios mais pequenos do que qualquer outra espécie dentro deste género. Consultando as medidas dos esporos obtidos do isolado CH57 e comparando-as com as da bibliografia, exclui-se a hipótese de ser este isolado uma *D. americana*. *D. iberica* e *D. sarmentorum* podem ser distinguidas pelos esporos, no entanto neste trabalho não foi possível concluir apenas com este critério a qual destas duas espécies pertenciam os 2 isolados. No entanto analisadas as filogenias com ITS, os isolados CH57 e CH59 alinham com *D.iberica*, espécie já encontrada antes em Portugal (Alves *et al.*, 2013) para o género *Quercus* (Phillips *et al.*, 2005).

Das duas espécies identificadas em eucalipto no âmbito deste trabalho a espécie *Neofusicoccum eucalyptorum* foi pela primeira vez isolada no nosso país. Esta espécie é considerada muito específica para eucalipto, no entanto já foi detetada também noutras *Myrtaceae*, família à qual pertence o eucalipto (Smith *et al.*, 2001; Slippers *et al.*, 2004b). Até agora a espécie *N. eucalyptorum* estava confinada a outras latitudes como Austrália, Africa do Sul e Chile e Uruguai (Slippers *et al.*, 2004b, 2009; Crous *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2013) sendo esta a primeira deteção desta espécie na Europa e no hemisfério norte.

N. parvum é uma espécie que possivelmente existe pelo Mundo inteiro, e que é dentro dos 17 géneros que constituem atualmente a família Botryosphaeriaceae, das menos específicas, atacando hospedeiros agrícolas a espécies florestais (Phillips *et*

al., 2013), no nosso país já tinha sido identificada em coníferas (Alves *et al.*, 2013) mas nunca em eucalipto.

Relativamente aos ensaios de patogenicidade ficou claro que com exceção da espécie *Dothiorella* todas as outras revelaram algum grau de agressividade nos hospedeiros dos quais foram isoladas. A espécie *D. corticola* foi a que se revelou mais agressiva para o sobreiro, confirmando que se trata de uma espécie que contribui grandemente para o declínio do montado (Branco *et al.*, 2014). No entanto a espécie *D. quercivora* por ser a primeira vez que é encontrada neste hospedeiro deverá ser alvo de estudos futuros, mais aprofundados, para se esclarecer o seu papel e a sua eventual contribuição para o declínio do montado. Relativamente os isolados identificados fora da família Botryosphaeriaceae, *Cryphonectria naterciae* não foi até agora considerado patogénico para o sobreiro (Bragança *et al.*; 2011) e *Biscogniauxia mediterranea* é considerado um parasita secundário (Henriques *et.al.*, 2016).

No caso dos ensaios com eucalipto, para ambas as espécies deste hospedeiro, *Eucalyptus nitens* e *E. globulus* foi a espécie *Neofusicoccum parvum* a que se revelou mais agressiva. O *E. nitens* comportou-se como sendo mais sensível do que *E. globulus* para ambas as espécies de *Neofusicoccum* o que pode ser uma boa notícia atendendo a que o *E. globulus* é a espécie mais comum e de maior valor comercial no nosso país (CELPA, 2015)

Quanto ao efeito que as espécies do eucalipto tiveram no sobreiro pode constatar-se que apenas *Neofusicoccum parvum* teve um efeito de parasita agressivo (o que se verificou também para *Eucalyptus nitens*) sendo o efeito de *N. eucalyptorum* pouco preocupante para o sobreiro. Neste hospedeiro no entanto a espécie mais agressiva foi efetivamente a espécie mais a ele associada, a *D. corticola* (Alves *et al.*, 2004). Relativamente ao efeito deste fungo nas duas espécies de eucalipto, o *E. nitens* parece ser mais sensível à ação de *D. corticola* do que *E. globulus*. No entanto esta espécie mais associada ao sobreiro parece ser realmente menos agressiva do que qualquer uma das que foram encontradas no eucalipto no âmbito deste trabalho.

Este tipo de testes de patogenicidade cruzados são importantes para estudar o potencial de os fungos causarem doença em hospedeiros diferentes daqueles em que são mais frequentemente encontrados, Os resultados deste trabalho fazem prever que a médio ou longo prazo quer o sobreiro quer o eucalipto, poderão vir a ser ainda mais afetados uma vez que pelo facto de partilharem as mesmas áreas geográficas estarão facilmente sujeitos a outras espécies que até aqui não eram seus parasitas, o que é reforçado pelo facto de vários autores referirem que é comum nestas espécies de

Botryosphaeriaceae haver facilmente a passagem de uns hospedeiros para outros (Pérez *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2010).

Em suma, dos 47 isolados diferentes, 32 foram isolados de sobreiro e 15 de eucalipto permitiram a confirmação da existência de 3 espécies diferentes em sobreiro e outras 2 espécies em eucalipto.

Diplodia corticola, *D. quercivora* (encontrada pela primeira vez em sobreiro e na Europa), *Dothiorella sp.* em sobreiro, e *Neofusicoccum parvum* (detetada pela primeira vez em eucalipto no nosso país) e *N. eucalyptorum* em eucaliptos (detetada pela primeira vez no hemisfério norte).

Os espécies que se usaram para fazer os testes cruzados, mostraram-nos que tanto podem ser patogénicas em sobreiro como em eucalipto, tendo sido nestes ensaios as duas espécies mais patogénicas a *D. corticola* e a *N. parvum* em ambos os hospedeiros. *E. nitens* revelou-se mais sensível que *E. globulus*.

5. BIBLIOGRAFIA

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17), 3389–3402pp.

Alves, A., Barradas, C., Phillips, A.J.L. & Correia, A. 2013. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 135, 791–804 pp.

Alves, A., Correia, A., Luque, J., Phillips, A. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96, 598–613pp.

Alves, A.M., Pereira, J.S. & Silva, J.M.N. 2007. A introdução e a expansão do eucalipto em Portugal – Capítulo 1, 13–26pp. Em *O Eucalipto em Portugal - Impactes Ambientais e Investigação Científica*. Editado por Alves, A.M., Pereira, J.S. & Silva, J.M.N. Editores. Lisboa: ISAPress, 398pp.

APCOR, 2016. Acedido a 8 de Fevereiro de 2016 em <http://www.apcor.pt/montado/#Floresta>

Borrvalho, N. M.G., Almeida, M.H. & Potts, B.M. 2007. O melhoramento do eucalipto em Portugal – Capítulo 3, 61-112 pp. Em *O Eucalipto em Portugal - Impactes Ambientais e Investigação Científica*. Editado por Alves, A.M., Pereira, J.S. & Silva, J.M.N. ISAPress, 398 pp.

Bragança, H., Rigling, D., Diogo, E., Capelo, J., Phillips, A. & Tenreiro, R. 2011. *Cryphonectria naterciae*: A new species in the *Cryphonectria*—*Endothia* complex and diagnostic molecular markers based on microsatellite-primed PCR. *Fungal Biology* 115, 852–861pp.

Bragança, H., Simões, S., Onofre, N., Tenreiro, R. & Rigling, D. 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal – Diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology* 37, 391–402 pp.

Bragança, H., Sousa, E. & Moreira, C. 2013. Sanidade dos Montados, 48-50 pp. Em *Livro verde dos Montados*. Editado por Pinto-Correia, T., Ribeiro, N. & Potes, J. Évora: ICAAM-Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas - Universidade de Évora, 65pp.

Branco, M., Bragança, H., Sousa, E. & Phillips, A. 2014. Pests and Diseases in Portuguese Forestry: Current and New Threats - Chapter 5, 117–154 pp. Em *Forest*

Context and Policies in Portugal-Present and Future Challenges. World Forests, Vol. 19. Editado por Reboredo, F. Suiça: Springer International Publishing, 239pp.

Bugalho, M. N., Caldeira, M. C., Pereira, J. S., Aronson, J. & Pausas, J. G. 2011. Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9, 278–286pp.

Cadahia, D., Cobos, J. M., Soria, S., Clauser, F., Gellini, R., Grossoni, P. & Ferreira, M. C. 1991. *Observação de danos em espécies florestais mediterrâneas*. Madrid: Grafur S.A.,

Carbone, I., Anderson, J.B. & Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553–556pp.

CELPA, 2015. *Boletim Estatístico da Celpa 2014*. Lisboa.

Costa, A. e Pereira, H. 2007. Montados e sobreirais: uma espécie, duas perspetivas, 17 – 37pp. Em *Árvores e Florestas de Portugal, Vol. 3: Os montados – muito para além das árvores*. Editado por Público, Comunicação Social, S.A. e Fundação Luso-Americana para o desenvolvimento.

Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55, 235– 253pp.

Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J-C, Pascoe, I., Wingfield, M.J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45, 129–140pp.

Dreaden, T. J., Black, A. W., Mullerin, S. & Smith, J. A. 2014. First Report of *Diplodia quercivora* Causing Shoot Dieback and Branch Cankers on Live Oak (*Quercus virginiana*) in the United States. *Plant disease* 98(2), 282pp.

ICNF, 2013. IFN6 - Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Lisboa, 34 pp. Acedido a 3 de Fevereiro de 2016 em <http://www.icnf.pt/portal/florestas/ifn/resource/ficheiros/ifn/ifn6-res-prelimv1-1>.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98pp.

Henriques J, Nóbrega F, Sousa E, Lima L. 2016. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of *Biscogniauxia mediterranea* isolates associated with cork oak. *Phytoparasitica*, DOI: 10.1007/s12600-015-0503-0.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120pp.

Linaldeddu, B. T., Sirca, C., Spano, D. & Franceschini, A. 2009. Physiological responses of cork oak and holm oak to infection by fungal pathogens involved in oak decline. *Forest Pathology* 39, 232–238pp.

Luque, J., Martos, S. & Phillips, A.J.L. 2005. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia* 97, 1111 –1121pp.

Luque, J., Pera, J. & Parladé, J. 2008. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* 38, 147-155pp.

Mehta, C. R. & Patel, N. R. 1996. *Exact Tests*. Cambridge, Massachusetts:

Cytel Software Corporation and Harvard School of Public Health. 220 pp.

Mehta, C. R. & Patel, N. R. 1997. *Exact inference in categorical data*. John Wiley & Sons. Reprint from Encyclopedia of Biostatistics. 12 pp.

Mohali, S., Slippers, B. & Wingfield, M.J. 2007. Identification of *Botryosphaeriaceae* from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. *Fungal Diversity* 25, 103–125pp.

Moreira, A.C. & Martins, J.M.S. 2005. Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *Forest Pathology* 35, 145–162pp.

Moreira, A.C., Ferraz, J.F.P. & Clegg, J. 1999. The involvement of *Phytophthora cinnamomi* in cork and holm oak decline in Portugal. Em *Proceedings of the 1st IUFRO international meeting on phytophthoras in forest and wildland ecosystems*. Editado por Hansen, E.M., & Sutton, W. Oregon, USA: Grants Pass, 132–135pp.

Natividade, J.V. 1990. *Subericultura*. 2ª ed. Lisboa, Portugal: Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Direcção-Geral das Florestas, 387 pp.

Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., & Wingfield, M. J. (2009). Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Mycologia* 101(5), 636–647pp.

- Pérez, C. A., Wingfield, M. J., Slippers, B., Altier, N. A., & Blanchette, R. A. (2009). *Neofusicoccum eucalyptorum*, a *Eucalyptus* pathogen, on native Myrtaceae in Uruguay. *Plant Pathology* 58(5), 964–70pp.
- Pérez, C. A., Wingfield, M. J., Slippers, B., Altier, N. A., & Blanchette, R. A. (2010). Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Diversity* 41(1), 53–69pp.
- Pessoa, F., Lidon, F. & Reboredo, F. 2014. Drought Effects on Portuguese Forest Cover – Chapter 3, 367–96 pp. Em *Forest Context and Policies in Portugal-Present and Future Challenges. World Forests, Vol. 19*. Editado por Reboredo, F. Suiça: Springer International Publishing, 239pp.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76, 51–167pp.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Correia, A. & Luque, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97 (2), 513–529pp.
- Silva, M., Diogo, E., Bragança, H., Machado, H. & Phillips, A. J. L. 2015. *Teratosphaeria gauchensis* associated with trunk, stem and foliar lesions of *Eucalyptus globulus* in Portugal. *Forest Pathology* 45, 224–234pp.
- Silva, M., Machado, H., & Phillips, A. J. L. (2009). *Mycosphaerella* species occurring on *Eucalyptus globulus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 125(3), 425–433pp.
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. 2004a. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96, 83–101pp.
- Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Carnegie, A. J. & Wingfield, M. J. 2004b. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies in Mycology* 50, 343–358pp.
- Slippers, B. & Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of Woody plants: diversity, ecology and impact (Review). *Fungal Biology Reviews* 21, 90–106pp.

- Smith, H., Crous, P. W., Wingfield, M. J., Coutinho, T. A., & Wingfield, B. D. (2001). *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia* 93(2): 277–285.
- Soares, P., Tomé, M. & Pereira, J.S. 2007. A produtividade do eucaliptal – Capítulo 2, 27–60pp. Em *O Eucaliptal em Portugal - Impactes Ambientais e Investigação Científica*. Editado por Alves, A.M., Pereira, J.S. & Silva, J.M.N. Lisboa: ISAPress, 398pp.
- Sousa, E. M. R., Santos, M. N. S., Varela, M. C. & Henriques, J. 2007. *Perda de vigor dos montados de sobro e azinho: análise da situação e perspectivas (Documento síntese)*. Portugal: Estação Florestal, 91 pp.
- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9, 678–687pp.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729pp.
- Valente, C., Machado, H. & Silva, M. 2008. Pragas e doenças do eucalipto, 37–51pp. Em *Pragas e doenças em Pinhal e Eucaliptal - Desafios para uma gestão integrada*. Editado por Branco, M., Valente, C. & Paiva, M. R. Lisboa: ISAPress, 234pp.
- van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Hallen, F., Crous, P. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S43–S54pp.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies, 315–322 pp. Em *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Editado por Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. e White, T. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 718 pp.

ANEXOS

Anexo I – Tabela com os resultados aos 40 dias dos ensaios de patogenicidade

	Hospedeiro	Espécie	Isolado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1ª Fase	<i>Quercus suber</i>	<i>Diplodia corticola</i>	CH7	E	E	C	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B	B	E	E	E	A	E	E
	<i>Quercus suber</i>	<i>Diplodia corticola</i>	CH60	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	<i>Quercus suber</i>	<i>Diplodia quercivora</i>	CH51	E	E	A	A	B	A	B	B	A	A										
	<i>Quercus suber</i>	<i>Dothiorella</i> sp.	CH57	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	<i>Quercus suber</i>	Testemunhas	Testemunhas	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2ª Fase	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	PE18	A	B	E	E	B	B	B	B	E	A										
	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	PE139	D	A	A	A	A	A	D	A	A	A										
	<i>Eucalyptus globulus</i>	Testemunhas	Testemunhas	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A										
	<i>Eucalyptus nitens</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	PE18	E	E	E	D	E	E	E	E												
	<i>Eucalyptus nitens</i>	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	PE139	B	D	E	E	B	B	B	A												
	<i>Eucalyptus nitens</i>	Testemunhas	Testemunhas	A	A	A	A	A	A	A	A												
	<i>Quercus suber</i>	Testemunhas	Testemunhas	A	A	A	A	A															
	<i>Quercus suber</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	PE18	E	A	E	E	E	D	A	E	E	E										
	<i>Quercus suber</i>	<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>	PE139	A	A	A	A	A	C	A	A	C	A										
	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Diplodia corticola</i>	CH60	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A										
	<i>Eucalyptus nitens</i>	<i>Diplodia corticola</i>	CH60	B	B	B	B	A	A	E	A												

Legenda: A = planta sem qualquer tipo de sintoma; B = poucas folhas secas; C = metade das folhas secas; D = mais de metade das folhas secas; E = planta totalmente seca

Anexo II - Tabela com os resultados da análise estatística dos ensaios de patogenicidade aos 40 dias

1ª Fase Ensaios (sobreiro inoculado com Botryosphaeriaceae isoladas de sobreiro)		
	<i>H</i>	<i>Significância</i>
CH7 Sb CH60 Sb CH51 Sb CH57 Sb	44,677	***
CH60 Sb CH51 Sb CH57 Sb	41,87	***
CH60 Sb T1 Sb (versus a testemunha)	39	***
CH7 Sb T1 Sb (versus a testemunha)	35,29	***
CH51 Sb T1 Sb (versus a testemunha)	11,6	**
CH57 Sb T1 Sb (versus a testemunha)	-	-
CH60 Sb CH51 Sb	21,09	***
CH60 Sb CH57 Sb	39	***
CH60 Sb CH7 Sb	5,571	*
CH7 Sb CH57 Sb	35,29	***
CH7 Sb CH51 Sb	11,17	**

2ª Fase Ensaios (eucalipto e sobreiro inoculados com Botryosphaeriaceae isoladas de eucalipto e sobreiro)

	<i>H</i>	<i>Significância</i>
PE18Sb PE18Ecn PE18Ecg PE139Sb PE139Ecn PE139Ecg CH60Ecn CH60Ecg T1Sb T1Ecn T1Ecg	47,08	***
PE18Ecn PE18Ecg PE139Ecn PE139Ecg CH60Ecn CH60Ecg (sem testemunhas)	25,21	***
PE18Ecn T1Ecn (versus a testemunha)	15	***
PE139Ecn T1Ecn (versus a testemunha)	11,67	**
CH60Ecn T1Ecn (versus a testemunha)	6,818	*
PE18Ecn PE139Ecn CH60Ecn e T1Ecn (versus a testemunha)	21,84	***
PE18Ecn PE139Ecn CH60Ecn (sem a testemunha)	12	***
PE18Ecn PE139Ecn	7,292	*
PE18Ecn CH60Ecn	11,72	**
PE139Ecn CH60Ecn	2,188	ns
PE18Ecg T1Ecg (versus a testemunha)	12,67	***
PE139Ecg T1Ecg (versus a testemunha)	2,11	ns
CH60Ecg T1Ecg (versus a testemunha)	-	ns
PE18Ecg E139Ecg	12,92	**
PE18Ecg CH60Ecg	12,67	***
PE139Ecg CH60Ecg	2,111	ns
PE18Sb PE18Ecn	1,7	ns
PE18Sb PE18Ecg	7,22	*
PE139Sb PE139Ecn	13,6	***
PE139Sb PE139Ecg	3,8	ns
PE18Ecn PE18Ecg	8,968	*
PE139Ecn PE139Ecg	11,05	*
CH60Ecn CH60Ecg	8,173	**
PE18Sb PE139Sb T1Sb	16,24	***
PE18Sb PE139Sb (sem testemunha)	12,92	***
PE18Sb T1Sb (versus a testemunha)	12,67	***
PE139Sb T1Sb (versus a testemunha)	12,111	ns
PE18Sb PE139Sb CH60Sb #	27,502	***
PE18Sb CH60Sb #	6,4444	*
PE139Sb CH60Sb #	29,000	***

Legenda: **Sb** - sobreiro; **Ecn** - *Eucalyptus nitens*; **Ecg** - *Eucalyptus globulus*; **PE18** - *Neofusicoccum parvum*; **PE139** - *Neofusicoccum eucalyptorum*; **CH 7 e CH60** - *Diplodia corticola*; **CH51** - *Diplodia quercivora*; **CH57** - *Dothiorella sp.* *** - $p < 0,001$ (altamente significativa); ** - $p < 0,01$ (muito significativa; significativa) * - $p < 0,05$ (significantes); ns - $p > 0,05$ (não significativa); # compararam -se os resultados da inoculação de CH60 em sobreiro na 1ª Parte do ensaio com os resultados das Botryosphaeriaceae isoladas de eucalipto e inoculadas em sobreiro na 2ª Parte do ensaio